

BIOMIMETISCHE PEPTIDISCHE
REZEPTOREN ZUR ERKENNUNG
BIOLOGISCH RELEVANTER MOLEKÜLE
-DESIGN, SYNTHESE UND POTENTIAL-

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von Diplom Chemikerin

Barbara Geibel

geboren in Emmendingen

Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen

Essen 2013

BIOMIMETISCHE PEPTIDISCHE
REZEPTOREN ZUR ERKENNUNG
BIOLOGISCH RELEVANTER MOLEKÜLE

Gutachter:	Prof. Dr. Carsten Schmuck
	Prof. Dr. Thomas Schrader
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Christian Mayer
Tag der Disputation:	19.12.2013

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2007 bis Oktober 2013 in den Instituten für Organische Chemie der Universitäten Würzburg und Duisburg–Essen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck angefertigt.

Ich erkläre hiermit des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, im Oktober 2013

.....
Barbara Geibel

DANKSAGUNG

Mein erster und größter Dank gilt *meinen Eltern*. Eure bedingungslose Unterstützung, Liebe und das Vertrauen in mich hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke euch für eure Unterstützung und Förderung und dass ihr es mir immer ermöglicht habt meinen eigenen Weg zu gehen.

Einen besonderen Dank möchte ich natürlich meinem Doktorvater *Prof. Dr. Carsten Schmuck* aussprechen, der mir die Gelegenheit gegeben hat im Rahmen meiner Doktorarbeit mich mit einem spannenden und herausfordernden Thema auf dem Gebiet der Supramolekularen Chemie zu verwirklichen. Auch danke ich für sein stetes Interesse, die erhaltene Unterstützung und das in mich gelegte Vertrauen, mit sehr viel Freiraum die eigene Arbeit und Aufgaben zu gestalten.

Meinen jetzigen wie auch ehemaligen *Arbeitskollegen* möchte ich hier für ihre Unterstützung und die sehr schönen Jahre im Arbeitskreis danken. Besonders danke ich meinen Kollegen *Dr. Sebastian Langolf*, *Dr. Uwe Machon*, *Dr. Michael Merschky*, *Ute Michels* und *Julia Schulz* für die schönen und lustigen Momente in unserem Labor.

Diese Arbeit hätte nicht ohne die Mithilfe vieler Personen aus der eigenen wie auch aus anderen Abteilungen fertiggestellt werden können. Ich möchte mich daher bei allen Angestellten in der Verwaltung, den analytischen Abteilungen, insbesondere *Werner Karow*, *Heinz Bandmann* und *Dr. Torsten Schaller*, Kollegen aus anderen Arbeitskreisen und allen, die irgendwann mit mir hier im Arbeitskreis gearbeitet haben, bedanken. Jeden einzelnen von zwei Universitäten aufzuführen würde wohl den Rahmen sprengen, daher bedanke ich mich im Besonderen bei: *Dr. Hans-Gert Korth* für die Vermittlung seiner langjährigen Erfahrung, *Wilhelm Sicking* für seine Rechenpower, *Christine Cangemi*, *Klaus Kowski*, *Elisabeth Verheggen*, *Pia Meren*, *Ursula Nüchter* für ihre Unterstützung und netten, lustigen Gespräche. Besonders freue ich mich, dass Pia wieder bei uns im Arbeitskreis ist. Weiterer Dank gilt auch allen meinen *Auszubildenden*, *Bachelorstudenten* und *Vertiefungspraktikanten*.

Dr. Michael Merschky und *Dr. Volker Bickert* gilt mein Dank für das Lesen dieser Arbeit. Bei Prof. *Dr. Thomas Schrader* bedanke ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Danken möchte ich auch *Bastel*, *Tassilo*, *Johannes* und *Christine* für unsere lustigen Mittagspausen und das leckere zimtige Essen. Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, Ratschläge und offenen Ohren. Vielen Dank für eure Hilfe. Danke auch an *Hilke* und *Johannes* für Gewährung meiner zahlreichen Asylanträge. Ein besonderer Dank geht auch an meinen *Opa*, *Klara*, *Burkhard* und *Elisabeth*. Danke für eure liebevolle Unterstützung, die Übernachtungsmöglichkeiten, das leckere Essen und den schweigsamen Fahrservice am Morgen.

Zum Schluss möchte ich meinem Freund *Michael* einen großen Dank aussprechen für die gemeinsamen schönen Zeiten während der Promotion und die besondere Geduld zum Schluss. Danke für deine Unterstützung und dass du an mich geglaubt hast.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. STAND DER FORSCHUNG	5
2.1 MOLEKULARE ERKENNUNG VON NUKLEOTIDEN IN WASSER	5
2.1.1 Aufbau und Struktur der Nukleotide.....	5
2.1.2 Physikalische Eigenschaften der Nukleotide.....	6
2.1.3 Erkennung von Nukleotiden in der Natur	7
2.1.4 Synthetische Rezeptoren zur Erkennung von Nukleotiden.....	9
2.2 SUPRAMOLEKULARE ERKENNUNG VON DNA UND RNA.....	17
2.2.1 Struktur der DNA und RNA	17
2.2.2 Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat.....	22
2.2.3 Erkennung der großen Furche der DNA	24
2.2.4 Erkennung der kleinen Furche	27
2.2.5 Interkalation zwischen den Basenpaaren	37
2.3 ERKENNUNG VON KOHLENHYDRATEN IN WASSER.....	41
2.3.1 Struktur und Funktion von Kohlenhydraten.....	41
2.3.2 Kohlenhydraterkennung in der Natur	42
2.3.3 Synthetische Kohlenhydratrezeptoren	46
3. KONZEPTION UND ZIELSETZUNG	51
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1 ENTWICKLUNG DER SYNTHESESTRATEGIEN	55
4.2 SYNTHESEN DER REZEPTOREN.....	60
4.2.1 Synthesen an der Festphase	60
4.2.2 Synthesen in Lösung	86
4.3 STUDIEN MIT AUSGEWÄHLTEN BIOLOGISCHEN SUBSTRATEN	105
4.3.1 Thermische DNA/RNA Denaturierung	107
4.3.2 Screening der Rezeptoren 71 und 86 mit biologisch relevanten Substraten.....	124
4.3.3 Fluoreszenz-Bindungsstudien.....	130
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	149
5.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	149
5.2 AUSBLICK	154

6. EXPERIMENTALTEIL	157
6.1 ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE UND ANALYTISCHE METHODEN.....	157
6.2 ALLGEMEINE REAKTIONSVORSCHRIFTEN FÜR DIE FESTPHASENSYNTHESE	164
6.3 SYNTHESEN AN DER FESTEN PHASE.....	168
6.3.1 Synthese des Rezeptors 71	168
6.3.2 Synthese des Rezeptors 72	170
6.3.3 Synthese des Rezeptors 73	172
6.4 SYNTHESEN IN LÖSUNG.....	173
6.4.1 Synthese von Baustein 57 für die Festphasensynthese	173
6.4.2 Synthese des Rezeptors 80	180
6.4.3 Synthesen der Rezeptoren 75, 85, und 86.....	184
6.4.4 Synthesen der Vergleichsrezeptoren 89 und 87	190
6.4.5 Synthesen der Rezeptoren 90 und 91	193
6.4.6 Synthese des Rezeptors 99	201
6.4.7 Synthese des Rezeptors 100.....	201
6.4.8 Synthese der Rezeptoren 101 und 102.....	203
6.4.9 Synthese des Rezeptors 103.....	206
6.4.10 Synthesen von Vorstufen potentieller Deckel für einen käfigartigen Rezeptor...	208
6.5 BINDUNGSSTUDIEN	213
6.5.1 Pufferlösungen.....	213
6.5.2 Polynukleotidlösungen.....	213
6.5.3 Allgemeine Vorgehensweise zur Durchführung der Fluoreszenztitationen	214
7. ANHANG	216
7.1 MESSDATEN.....	216
7.1.1 Stabilitätsmessung der Rezeptoren 71-73, 75, 86, 87, 89-91, 99-103.....	216
7.1.2 Fluoreszenztitationsexperimente	217
7.1.3 HPLC-Reinheitsläufe der Rezeptoren 71-73, 75, 86, 87, 89-91, 99-103	221
7.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	226
7.3 LITERATURVERZEICHNIS	231

1. EINLEITUNG

Die chemischen Grundlagen vieler biologischer Prozesse sind heute bekannt. Mit Beginn der Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA von *Watson, Crick*¹ und *Franklin*² kam es zur Aufklärung der Übersetzungsprozesse verschlüsselter Erbinformation vom Gen zum Protein. Ebenso sind die dreidimensionale Struktur und der Wirkungsmechanismus einer Vielzahl von Proteinen, die in nahezu allen biologischen Prozessen von der Immunabwehr über Signaltransduktion bis hin zur Stoffwechselregulation eine essentielle Rolle spielen, erfolgreich aufgeklärt worden, um nur einige Beispiele zu nennen.³ Die Erkenntnis und das Wissen über die Grundlagen dieser zentralen Lebensvorgänge befriedigen nicht nur das Interesse und die Neugier des Wissenschaftlers, sondern schaffen darüber hinaus die Möglichkeit, durch gezielte Eingriffe diese Vorgänge zu beeinflussen. Durch diese Art der Beeinflussung besteht die Möglichkeit für Krankheiten wie z. B. Krebs oder Erbkrankheiten Medikamente gezielt zu entwickeln. Da aber letztendlich nicht alle biologischen Prozesse vollständig in ihrer ganzen Komplexität verstanden sind, können künstliche Modellsysteme einen detaillierten Einblick in diese komplexen biologischen Systeme und Prozesse schaffen und die Grundlage zur Entwicklung von Medikamenten sein. Die Entwicklung und Synthese solcher Modellsysteme auf Grundlage des vorhandenen Wissens fällt unter anderem in das Forschungsgebiet des Chemikers.

Vielen biologischen Erkennungsprozessen liegen gemeinsame molekulare Muster und Prinzipien zugrunde. Ein Hauptmerkmal in der molekularen Erkennung ist die Komplementarität von Rezeptor und Substrat sowohl in der Form als auch in der chemischen Struktur. Man weiß heute, dass die Erkennung zwischen Rezeptor und Substrat nicht zwangsläufig nach dem sogenannten Schlüssel-Schloss-Prinzip^{4,5} erfolgt, welches von einer starren Struktur des Rezeptors und des Substrats ausgeht. Stattdessen spricht man bei vielen biologischen Prozessen von einem „induced-fit“, bei dem Rezeptor und Substrate ihre Strukturen aneinander anpassen, so dass eine optimale Bindung erreicht wird.⁶ Solch eine effektive Rezeptor-Substrat-Bindung erfolgt in einer flexiblen Kavität unter Ausnutzung einer Vielzahl von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoff-Brückenbindung, π -Stapelwechselwirkungen, elektrostatischen, Dispersions- und Dipolwechselwirkungen. Ebenso spielen z. B. auch entropische Beiträge^{7,8} und Kooperativität⁹ eine Rolle. Das Anliegen der Supramolekularen Chemie ist es, über die auf Knüpfung kovalenter Bindung basierende molekulare Chemie hinaus, diese intermolekularen Wechselwirkungen zu verstehen und zu kontrollieren (s. Abbildung 1-1).¹⁰

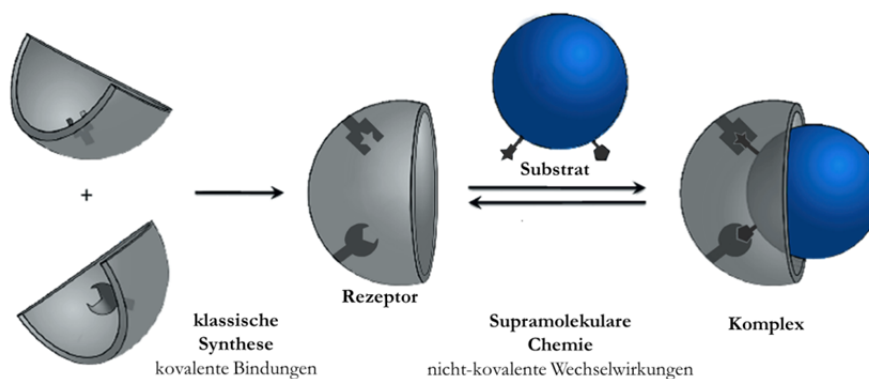


Abbildung 1-1: Zusammenhang zwischen molekularer Synthese und supramolekularen Systemen.

Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von den gemeinsamen molekularen Mustern und Prinzipien, die den biologischen Erkennungsprozessen zugrunde liegen, ein biomimetisches allgemein anwendbares Rezeptorkonzept zu entwerfen und dessen Potential bezüglich der Bindung ausgewählter biologisch relevanter Substrate einzuschätzen. Die generelle Struktur des Rezeptors sollte die Bindungsstellen natürlicher Rezeptoren nachahmen und das Potential zu funktionellen Variationen bieten, um das unterschiedliche Zusammenspiel von Wechselwirkungen verschiedener Substrate komplementieren zu können. Als interessante Substrate zur Einschätzung des allgemeinen Potentials der Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit Polynukleotide, Nukleotide und Kohlenhydrate ausgewählt.

Die Kohlenhydraterkennung vermittelt unter anderem die Zelladhäsion, die Infektion von Zellen durch Pathogene, die Verteilung und Reaktivität von Proteinen in den Zellen und viele Formen der Immunreaktion.^{3,11} Man kann somit sagen, dass die an der Oberfläche sitzenden Kohlenhydrate der Zelle eine Art Identität geben. Die Komplexierung von Kohlenhydraten im wässrigen Medium stellt eine besondere Herausforderung dar, da die OH-Gruppe als dominierende Funktionalität sich nur schwer von den Wassermolekülen, die ebenfalls mit den vorhandenen Bindungsstellen des Rezeptors wechselwirken, unterscheiden lässt. Diese Herausforderung lässt sich nur meistern, wenn es unter Einbeziehung einer breiten Vielfalt nicht-kovalenter Wechselwirkungen gelingt, eine möglichst perfekte Umgebung für den Gast zu entwerfen. Auch Nukleotide sind allgegenwärtig in biologischen Systemen und übernehmen Schlüsselfunktionen in Prozessen wie der DNA-Synthese, Energie- und Elektronentransferprozessen,¹² der Zellkommunikation¹³ oder dem Membrantransport.¹⁴

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese biomimetischer peptidischer ein- bis dreiarmer Rezeptoren und die Einschätzung des Potentials der Rezeptoren Nukleotide, Polynukleotide und Zucker zu binden. Durch die Wahl eines geeigneten Templates, an dem die Rezeptorarme aufgebaut werden, sollen die Rezeptoren in der Lage sein eine präorganisierte Kavität zu bilden, in der die Substrate gebunden werden können. Die peptidische Struktur dient einerseits zur

möglichst perfekten Nachahmung der natürlichen Bindungsstellen als auch als geeignetes Gerüst zur synthetischen Variation. Die eigentliche Synthese der Rezeptoren durch Knüpfung der Peptidbindung bleibt im Wesentlichen gleich, unabhängig von den Seitenketten der Aminosäuren, so dass mit der Entwicklung einer Synthesestrategie Rezeptoren bestehend aus verschiedenen Aminosäuren und damit verschiedenen Wechselwirkungsmöglichkeiten synthetisiert werden können. Aminosäuren als Bausteine bieten das Potenzial künstliche Rezeptoren sowohl mittels rationaler Ansätze als auch kombinatorischer Chemie oder einer Kombination beider Syntheseansätze aufzubauen. Erkennen die synthetisierten Rezeptoren die ausgewählten Substrate kann durch weitere Variation der Aminosäuren versucht werden sowohl die Bindungsstärke als auch die Selektivität zu optimieren. Derartige Rezeptorsysteme können ein besseres Verständnis der entsprechenden biologischen Erkennungsprozesse von z. B. Kohlenhydraten, Polynukleotiden oder Nukleotiden ermöglichen.

2. STAND DER FORSCHUNG

2.1 Molekulare Erkennung von Nukleotiden in Wasser

2.1.1 Aufbau und Struktur der Nukleotide

Nukleotide sind die Bausteine der DNA und RNA (s. Kapitel 2.2.1) und erfüllen in Zellen lebensnotwendige regulatorische Aufgaben, so fungiert z. B. ATP (Adenosintriphosphat) als Energieträger und als Regulator für energieliefernde Prozesse. Alle Nukleotide sind aus drei Bausteinen - einer heterocyclischen Base, einer Pentose und einem Phosphatrest - aufgebaut. Die Basen sind die Purine Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidine Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U) (s. Abbildung 2-1).

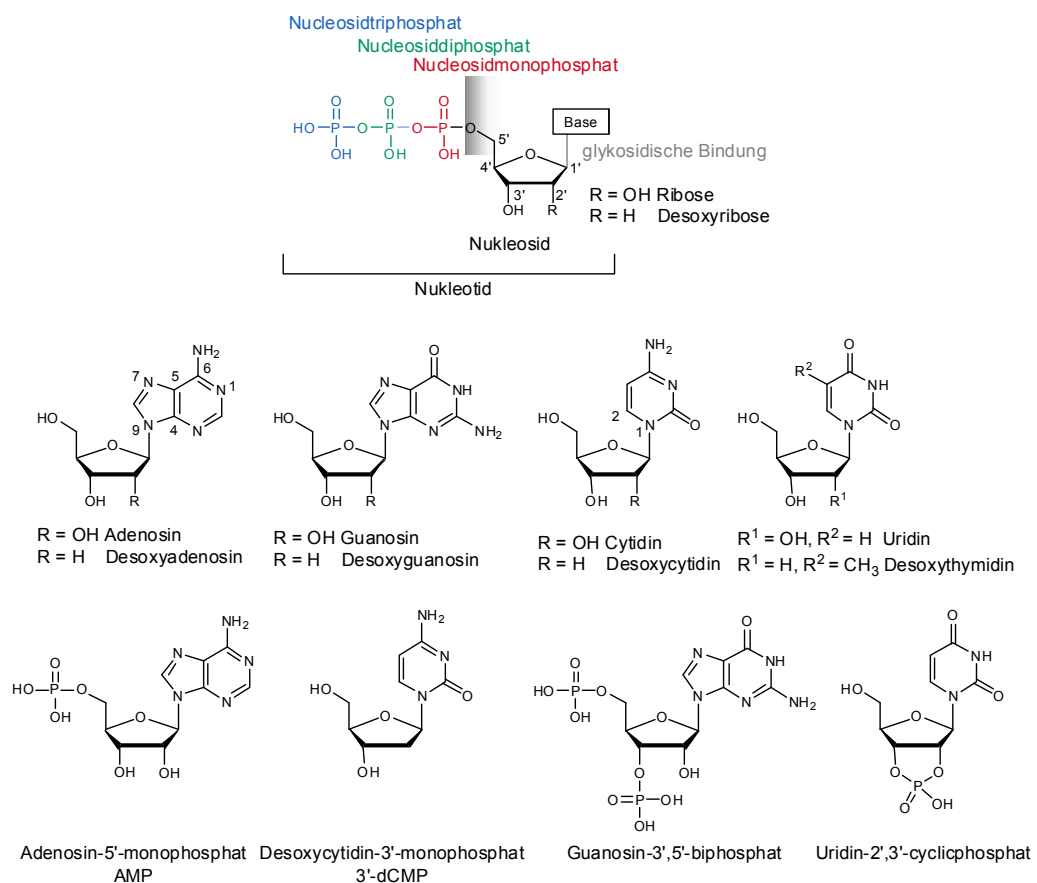
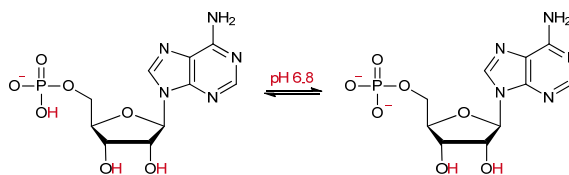


Abbildung 2-1: Strukturen der Nukleotide und Nucleoside. **Oben:** Aufbau der Nukleotide und Nucleoside. Die Nucleoside bestehen aus einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose) und sind am C1'-Atom über eine β -glykosidische Bindung mit einer heterocyclischen Base (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin oder Uracil) verknüpft. Die Phosphatester der Nucleoside werden als Nukleotide bezeichnet. **Mitte:** Strukturen der vier vorkommenden Ribonucleoside der RNA und der vier Desoxyribonucleoside der DNA. **Unten:** Strukturen verschiedener bekannter Nukleotide.¹⁵

Die sogenannten Nukleobasen sind über eine β -glykosidische Bindung mit dem C1'-Atom der Pentose verknüpft (Purine über das N9-Atom, Pyrimidine über das N1-Atom). Bausteine, die nur aus Nukleobase und Zucker aufgebaut sind und keinen Phosphatrest aufweisen, werden als Nucleoside bezeichnet. Die Pentose ist entweder *D*-Ribofuranose oder 2-Desoxy-*D*-ribofuranose, welche wiederum über eine der Hydroxylgruppen mit einem Mono-, Di- oder Triphosphat verestert sind. Entsprechend der enthaltenen Nukleobase und des Zuckers werden die Nucleoside wie folgt benannt: Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin (s. Abbildung 2-1). Die Phosphatester der Nucleoside werden als Nukleotide bezeichnet. Die einfachsten Nukleotide mit nur einer veresterten Hydroxylgruppe sind z. B. Adenosin-5'-monophosphat (AMP) oder Desoxycytidin-3'-monophosphat (3'-dCMP). Nukleotide mit zwei Phosphatmonoestern am selben Zucker werden als Nucleosidbiphosphate (z. B. Guanosin-3',5'-biphosphat) bezeichnet während Nucleosidmonoester der Pyrophosphorsäure als Nucleosiddiphosphate (z. B. Adenosin-5'-diphosphat, ADP) bezeichnet werden (s. Abbildung 2-1). Die Nucleosidester der Tripolyphosphorsäure werden als Nucleosidtriphosphate bezeichnet. Ein klassisches Beispiel für ein Nucleosidtriphosphat ist das Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Cyclische Nukleotide sind Nucleoside, bei denen zwei benachbarte Hydroxylgruppen derselben Pentose durch eine Phosphatgruppe verestert sind z. B. Uridin-2',3'-cyclicphosphat oder Adenosin-3',5'-cyclicphosphat, cAMP (s. Abbildung 2-1).¹⁵

2.1.2 Physikalische Eigenschaften der Nukleotide

Eigenschaften wie pK_s -Werte, Verteilung der Ladung und Wasserstoff-Donor- und Akzeptor-Eigenschaften spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der Nukleotide und ihrer einzelnen Bausteine. Betrachtet man die einzelnen pK_s -Werte der Nukleobasen, ist zu erkennen, dass alle bei einem pH im physiologischen Bereich ($5 < \text{pH} < 9$) ungeladen sind (s. Abbildung 2-2). Ebenso sind auch Ribose und Desoxyribose in diesem pH-Bereich nicht geladen, erst ab pH-Werten über 12 werden auch die Zucker-OH-Gruppen des Nucleosids deprotoniert. Die Phosphatreste besitzen bei einem $\text{pH} \geq 1$ eine negative Ladung und werden im Fall eines Monoesters bei $\text{pH} \approx 7$ ein zweites Mal deprotoniert. Somit liegen die Phosphomonoester bei neutralem pH als zweifach geladene Verbindungen vor (s. Abbildung 2-2).



Nukleobase	Nucleosid	3'-Nukleotid	5'-Nukleotid
Adenin (N1)	3.63	3.74	3.74
Cytosin (N3)	4.11	4.30	4.56
Guanin (N7)	2.20	2.30	2.40
Guanin (N1)	9.50	9.36	9.40
Thymin (N3)	9.80	-	10.00
Uracil (N3)	9.25	9.43	9.50

Abbildung 2-2: Physiologisch relevante Strukturen der Nukleotide am Beispiel von Adenosin-5'-monophosphat und pK_s -Werte der Nukleobasen.¹⁵

Die Amin- und Ketogruppen der heterocyclischen Nukleobasen können in einem Keto-Enol- oder Amin-Imin-Gleichgewicht vorliegen. UV, NMR und IR-spektroskopische Untersuchungen belegen jedoch, dass bei physiologischen pH das Gleichgewicht zu 99,99 % auf der Seite der Keto-Amin-Form liegt. Die aufgrund des Gleichgewichts ausschließlich vorliegenden Keto- und Amingruppen in Kombination mit zusätzlichen freien Elektronenpaaren oder Wasserstoffen der Heteroatome des cyclischen System ergeben für jede Base ein charakteristisches Donor- und Akzeptor-Wasserstoff-Bindungsmuster (s. Abbildung 2-3).

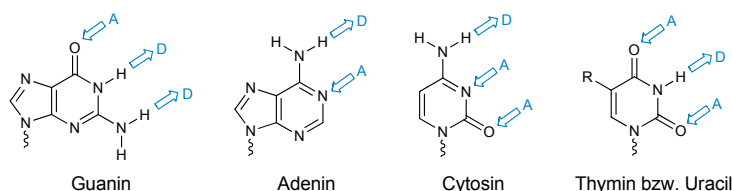


Abbildung 2-3: Darstellung der charakteristischen Donor- und Akzeptor-Muster der einzelnen Nukleobasen, die durch die Wasserstoffatome der Heteroatome bzw. die freien Elektronenpaare der Amin- und Ketogruppen zustande kommen.¹⁵

Dieses H-Brücken-Muster ist entscheidend für die selektive Basenpaarung der DNA und somit auch für die Weitergabe der genetischen Information. Neben der Möglichkeit Wasserstoff-Brückenbindungen auszubilden, besitzen die Nukleotide auch die Möglichkeit aufgrund der heterocyclischen Ringsysteme π - π - und hydrophobe Wechselwirkungen zu formen. Für die Stabilität des DNA-Doppelstrangs sind hauptsächlich die π - π -Stapelwechselwirkungen zwischen den Basenpaaren verantwortlich.¹⁵

2.1.3 Erkennung von Nukleotiden in der Natur

Die Erkennung von Nukleotiden, Nukleotid-Basenpaaren oder auch kurzen Nukleotid-Sequenzen spielt in vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Nukleotide sind z. B.

beteiligt an DNA/RNA-Synthese und Abbau, an Energie- und Elektronentransferprozessen,¹² Zellkommunikation¹³ oder Membrantransporten.¹⁴ Bei der strukturellen Entwicklung künstlicher Rezeptoren zur Erkennung von Nukleotiden ist das Wissen über die Struktur und den Erkennungsprozess natürlicher Enzyme von großem Nutzen. Als Beispiel für die Erkennung von Nukleotiden in der Natur sollen hier die Nukleasen dienen. Nukleasen sind Enzyme, die die hydrolytische Spaltung von DNA oder RNA katalysieren und somit verantwortlich für die Verdauung bzw. den Abbau von Nukleinsäuren sind. Die Enzyme, die für den Abbau der RNA verantwortlich sind, werden als Ribonukleasen bzw. RNasen bezeichnet.³ Die Ribonuklease T1 gehört zu den mikrobiellen Enzymen und katalysiert die Spaltung der Phosphodiester-Bindung in einzelsträngiger RNA. Sie bindet spezifisch an Guanin. Das aktive Zentrum der RNasen setzt sich zusammen aus einem substratspezifischen Erkennungsbereich und einem katalytischen Bereich, der für die Spaltung der Phosphodiester-Bindung verantwortlich ist. Abbildung 2-4 zeigt die Bindung des Guanosin-2'-monophosphats (2'-GMP) an das aktive Zentrum der RNase T1.

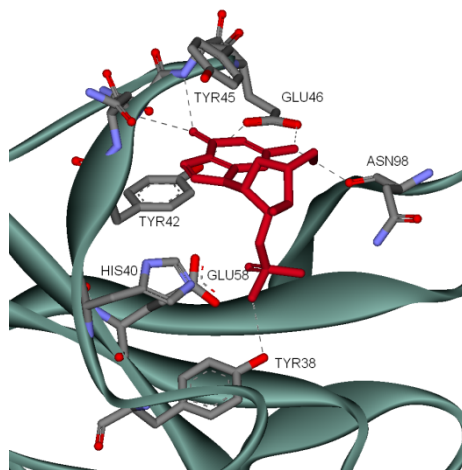


Abbildung 2-4: Röntgenkristallstruktur der Ribonuklease T1 mit Guanosin-2'-monophosphat (2'-GMP), welches im aktiven Zentrum gebunden wird (PDB 1NRT).¹⁶

Die Bindung des Guanins erfolgt hauptsächlich über das Peptidrückgrad des Peptidsegments von Tyr42 bis Glu46 und Asn98. Der N(7)-Stickstoff und der O(6)-Sauerstoff des Guanins dienen als Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren für die Wasserstoffe der NH-Gruppen von Asn43, Asn44 und Tyr45. Als Wasserstoff-Brücken-Donoren fungieren N(1)-H und N(2)-H, die Wasserstoff-Brückenbindungen zur Carboxylgruppe von Glu46 ausbilden. Zusätzlich formt N(2)-H eine Wasserstoff-Brückenbindungen zur Carbonylgruppe von Asn98. Zusätzlich zu den polaren Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrad bilden die phenolischen Seitenketten von Tyr42 und Tyr45 hydrophobe sandwichartige Wechselwirkungen aus. Tyr42 wechselwirkt mit der Carbonylgruppe, die sich an Position 6 des Guanins befindet, während der Phenylrest von Tyr45 in einem Abstand von 3.5 Å parallel zur Ebene der Nukleobase liegt und so in der

Lage ist π - π -Wechselwirkungen aus zu bilden (s. Abbildung 2-4). Es gibt keinerlei Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen dem Ribosering und dem Enzym, aber die Phosphatgruppe des Guanosin-2'-monophosphats bildet Wechselwirkungen polarer Natur mit Tyr38, His40 und Glu58 aus. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Nukleotide z. B. Guanosin-3'-monophosphat in der Lage sind, auch zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Ribosering auszubilden.^{17,18} Entscheidend bei der Erkennung der Nukleotide ist das Zusammenspiel sowohl der Wasserstoff-Brückenbindungen als auch hydrophober Wechselwirkungen. Ebenso können zusätzlich ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen zur Erkennung und zur Bindungsstärke beitragen. Die Natur ist in der Lage eine Vielzahl von einzelnen eher schwachen nicht-kovalenten Wechselwirkungen zu nutzen und in Summe eine ausreichend starke Bindung zu erzielen. Somit stellt die Kombination dieser möglichen einzelnen Wechselwirkungen eine vielversprechende Grundlage für das Design von effektiven und selektiven künstlichen Rezeptoren dar.

2.1.4 Synthetische Rezeptoren zur Erkennung von Nukleotiden

In der Literatur findet sich eine große Anzahl von Beispielen für Nukleotidrezeptoren, die sowohl in organischen Lösemitteln als auch im wässrigen Medium Nukleotide binden. Die folgende Auswahl der Beispiele wird sich aufgrund der biologischen Relevanz auf Rezeptoren beschränken, die Nukleotide in Wasser erkennen. Künstliche Rezeptoren, die Nukleotide im wässrigen Medium erkennen, können hohe Bindungskonstanten bis zu 10^7 M^{-1} erzielen.

Aufbau und Struktur der Nukleotide bedingen die Art und Anzahl an Wechselwirkungen, die möglich sind. Abbildung 2-5 zeigt schematisch die theoretisch möglichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen, die ein Nukleotid bzw. die einzelnen Bausteine des Nukleotids – Nukleobase, Zucker und Phosphatrest – eingehen können.

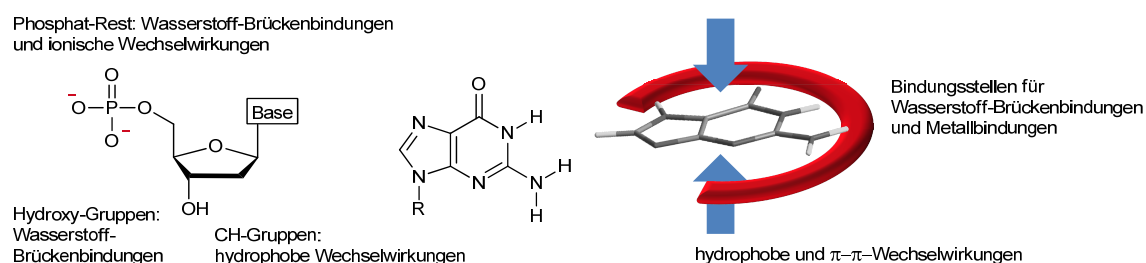


Abbildung 2-5: Illustration der möglichen nicht-kovalenten Bindungen, die die Nukleotide ausbilden können, gezeigt am Beispiel des Desoxyguanosin-5'-monophosphats.

Der Ribosering eines Nukleotids ist im wässrigen Medium nicht einfach zu erkennen. Die Hydroxylgruppen sind zwar in der Lage Wasserstoff-Brückenbindungen auszubilden, konkurrieren aber mit den Wassermolekülen des Lösemittels, da sie schwer von diesen zu

unterscheiden sind. Die CH-Bindungen des Zucker-Kohlenstoff-Gerüsts können durch hydrophobe CH/ π -Wechselwirkungen erkannt werden, aber auch diese sind eher schwach und unspezifisch. Beispiele für künstliche Kohlenhydratrezeptoren, die Kohlenhydrate im wässrigen Medium erkennen, sind selten. Der bis jetzt beste künstliche Kohlenhydratrezeptor bindet Kohlenhydrate mit einer Bindungsstärke von etwa $5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ in Wasser (s. Kapitel 2.3).¹⁹ Die Phosphatreste der Nukleotide sind aufgrund ihrer Ladung und ihrer Möglichkeit Wasserstoff-Bindungen einzugehen wesentlich einfacher zu binden. Eine große Anzahl von künstlichen Rezeptoren, die zur Bindung der Phosphatreste entwickelt wurden, sind Polyamine, die aufgrund der positiv geladenen Ammoniumgruppen in der Lage sind, mit den negativ geladenen Phosphatresten ionische Wechselwirkungen einzugehen. Um jedoch eine effektivere Erkennung zu erreichen, sind neben den ionischen Wechselwirkungen formenden Ammoniumgruppen Bindungsstellen erforderlich, die zusätzliche Wasserstoff-Bindungen oder π -Stapelwechselwirkungen ausbilden können. *Bencini* und Mitarbeiter entwickelten einen cyclischen Polyammonium-Rezeptor mit einer Phenanthrolin-Einheit innerhalb des Makrocyclus **1** (s. Abbildung 2-6).²⁰

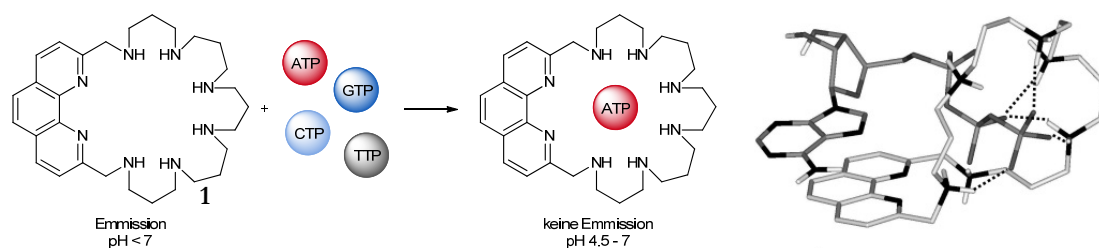


Abbildung 2-6: Links: Rezeptor **1** bindet selektiv ATP gegenüber GTP, TTP und CTP. Fluoreszenzmessungen zeigen, dass Rezeptor **1** in einem engen pH-Bereich ATP detektiert aufgrund von Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer von einer Aminogruppe zur Phenanthrolin-Einheit. **Rechts:** NMR-Messungen und Molecular Modeling zeigen, dass bei der Bindung von ATP die Phosphatkette des Nukleotids starke elektrostatische und Wasserstoff-Bindungen mit den Ammoniumgruppen des protonierten Rezeptors ausbildet, während die Nukleobase über π -Stapelwechselwirkungen mit der Phenanthrolin-Einheit wechselwirkt.²⁰ Reprinted with permission from C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Biagini, E. Faggi, S. Meini, C. Giorgi, A. Spepi, B. Valtancoli, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 7349-7363. Copyright 2009 American Chemical Society.

Die Phenanthrolin-Einheit dient nicht nur zur Erkennung der Nukleobase über hydrophobe oder π -Stapelwechselwirkungen sondern fungiert auch als Fluorophor. Die zusätzliche Fluorophor-Einheit ermöglicht den Einsatz des Rezeptors **1** als potentiellen selektiven Chemosensors für Nukleotide. Potentiometrische Messungen belegen dass Rezeptor **1** ATP in 1:1-Komplexen mit sehr hohen Bindungskonstanten von $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ bindet. Die weiteren Nukleotide CTP, TTP und GTP wurden mit einer um ein bis zwei Größenordnungen kleineren Bindungskonstante gebunden. Bei der Bestimmung der Bindungskonstante mittels potentiometrischer Messungen - besonders beim Vergleich mit Bindungskonstanten die durch NMR-, UV- oder Fluoreszenzmessungen ermittelt wurden - ist zu berücksichtigen, dass sich

die Konstanten nur auf einen einzelnen theoretischen Protonierungsgrad beziehen und keine effektive Bindungskonstante, welche vermutlich um mehrere Größenordnungen kleiner wäre, wiedergeben. NMR-Messungen zeigen, dass die Stärke der Bindung mit Rezeptor **1** in der Reihenfolge $\text{ATP} > \text{GTP} > \text{TTP} > \text{CTP}$ abnimmt. Anhand der Verschiebung der NMR-Signale lässt sich belegen, dass die $\text{ATP}:\mathbf{1}$ -Komplexe sowohl die stärksten ionischen Wechselwirkungen zwischen der Phosphatkette und den Aminen als auch die stabilsten π - π -Wechselwirkungen zwischen Adenin und der Phenanthrolin-Einheit ausbilden. Zusätzlich zu den NMR-Studien belegen auch Molecular Modeling und eine Kristallstruktur eines Komplexes, dass die Polyaminkette eine Kavität für die Phosphatreste formt, in der diese durch Ionenpaare und Wasserstoff-Bindungen gebunden werden, während die Nukleobase parallel zur Ebene des Phenanthrolins gebunden wird (s. Abbildung 2-6). Untersuchungen eines analogen um eine Amingruppe kleineren Makrocyclus ergaben für ATP eine um drei Größenordnungen kleinere Bindungskonstante von 10^6 M^{-1} . Hiermit lässt sich zeigen, dass sowohl die Kombination und das Zusammenspiel der Wechselwirkungen als auch die perfekte Geometrie Voraussetzung für eine effiziente Bindung sind.²⁰

Durch Kombination von Diazakronenethern und Pyren-Einheiten synthetisieren *Inouye* und Mitarbeiter Rezeptor **2**, der, wie in Abbildung 2-7 zu sehen, Nukleotide ebenfalls durch Ausnutzung elektrostatischer und sandwichartiger π - π -Wechselwirkungen erkennen kann. UV/Vis-Bindungsstudien in Wasser ergaben für die Nukleotide ATP, GTP, CTP und UTP Bindungskonstanten im Bereich von $2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bis $1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, während die entsprechenden Di- und Monophosphate mit Bindungsstärken um etwa eine bis drei Größenordnungen kleiner gebunden wurden (s. Abbildung 2-7).²¹

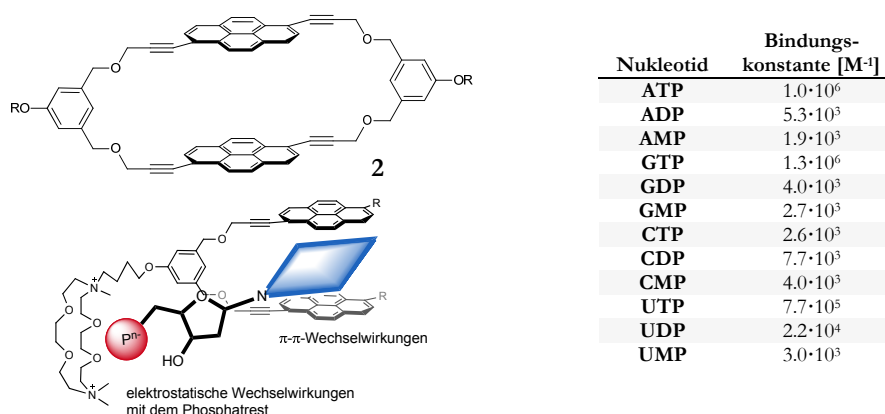


Abbildung 2-7: Rezeptor **2** bindet verschiedene Nukleotide mit Bindungskonstanten im Bereich von $2.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bis $1.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Die schematische Abbildung zeigt die elektrostatischen Wechselwirkungen des Phosphats mit dem Kronenether und die sandwichartigen π - π -Wechselwirkungen der Nukleobase mit den Pyren-Einheiten.²¹

Die meisten Nukleotidrezeptoren nutzen zur Bindung ionische Wechselwirkungen häufig in Kombination mit π - π -Wechselwirkungen durch aromatische Einheiten. Neben solchen, im

wässrigen Medium sehr effektiven, π - π -Wechselwirkungen stellen zusätzliche hydrophobe und disperse Wechselwirkungen weitere Möglichkeiten zur Ausnutzung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen in Wasser dar. Calixarene und Cyclodextrine formen jeweils geeignete hydrophobe Kavitäten und wurden erfolgreich als Erkennungseinheiten für Nukleotid-rezeptoren genutzt. *Schneider* und Mitarbeiter entwickelten die in Abbildung 2-8 gezeigten Cyclodextrin-basierten Rezeptoren **3** und **4**, in denen entweder zwei bzw. alle sieben primären Hydroxylgruppen des β -Cyclodextrins (CyD) durch Methylaminogruppen ersetzt wurden (s. Abbildung 2-8).²²

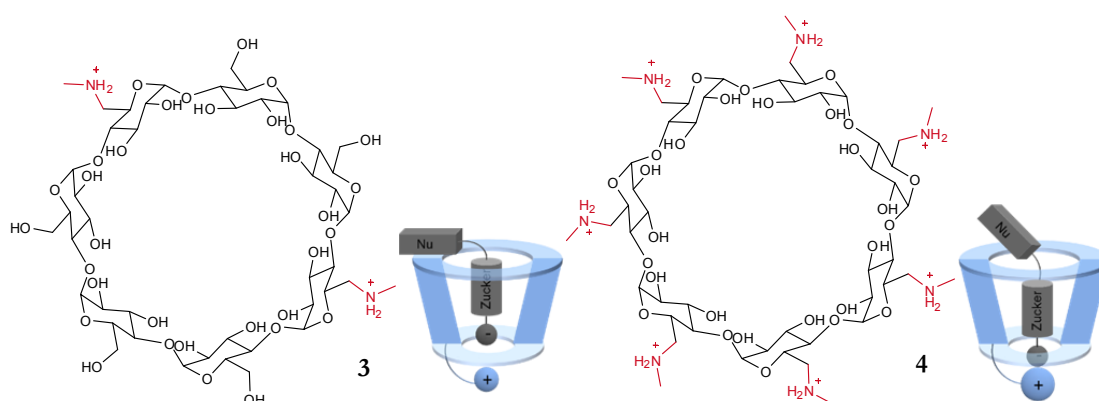


Abbildung 2-8: Strukturen der auf Cyclodextrin basierenden Nukleotidrezeptoren **3** und **4**. Die Bindung zwischen Rezeptor und Nukleotid beruht auf stabilen Salzbrücken zwischen den Ammoniumresten und den geladenen Phosphatgruppen. Hinzu kommen disperse Wechselwirkungen zwischen dem Zucker und den CH-Gruppen innerhalb der Kavität des Cyclodextrins.

Cyclodextrine sind aus cyclisch α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen aufgebaut, die eine toroidale Struktur mit einem Hohlraum und einer größeren und einer kleineren Öffnung bilden. Sie sind aufgrund der Hydroxylgruppen am oberen und unteren Rand hervorragend wasserlöslich und zeichnen sich durch einen Hohlraum aus, der leicht hydrophob und damit weniger hydrophil als das umgebende Wasser ist. Rezeptor **4** bindet ATP in Wasser mit einer Bindungskonstante von $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Die negativ geladene Phosphateinheit des Nukleotids wird durch die geladenen Ammoniumgruppen gebunden, während die Ribose-einheit im Inneren der Kavität über disperse CH-CH-Wechselwirkungen erkannt wird. Im Gegensatz zu ATP wird AMP mit einer um mehr als eine Größenordnung kleineren Bindungskonstante von $9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ gebunden. Allerdings ist CyD **4** nicht in der Lage, zwischen den einzelnen Nukleobasen, der Art des Zuckers (Ribose oder Desoxyribose) oder der Position des Phosphatrestes (3'- oder 5'-Position) zu unterscheiden. Im Gegensatz zu Rezeptor **4** ist Rezeptor **3** wesentlich selektiver und kann zwischen Nukleobase, Zucker und Position des Phosphats unterscheiden. Allerdings geht die hohe Selektivität auf Kosten der Affinität, so dass die Bindungskonstanten etwa ein bis zwei Größenordnungen kleiner sind als bei Rezeptor **4** (z. B. 10^5 M^{-1} für ATP). NMR-Studien und computergestützte Rechnungen liefern den Grund für

die Selektivitäts- und Affinitätsunterschiede. Den Hauptbeitrag zur Bindungsstärke liefern die ionischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen Phosphat- und Ammoniumgruppen. Der zweite Beitrag zur Bindungsstärke kommt nicht durch Wechselwirkungen mit den Nukleobasen zustande, sondern von Wasserstoff-Bindungen zwischen Zuckerrest und der inneren Wand der Kavität. Die Anzahl der Wasserstoff-Bindungen ist auch der Grund, warum Ribose stärker gebunden wird als die hydrophobere Desoxyribose. Die Selektivität in Bezug auf die Nukleobasen lässt sich durch sekundäre, schwache Wechselwirkungen mit den Hydroxylgruppen am oberen Rande des CyDs erklären. Der höher geladene Rezeptor **4** zieht das Nukleotid tiefer in die Kavität und verhindert so die für die Selektivität erforderlichen Wechselwirkungen (s. Abbildung 2-8).

Neben den bereits erwähnten Erkennungsmotiven dienen auch peptidische Strukturen zur Erkennung von Nukleotiden. Sie eignen sich besonders gut als Modellsysteme für natürliche Nukleotid-bindende Enzyme und deren Untersuchung. Ebenso lassen sich peptidische Strukturen relativ einfach in großer Zahl mittels sogenannten kombinatorischen Bibliotheken variieren und die so erhaltenen Verbindungen auf Selektivität und Affinität in einem Screening untersuchen.

Anslyn und Mitarbeiter synthetisierten eine kombinatorische Bibliothek **5** mit 4913 Mitgliedern, die in Bezug auf ihre Selektivität für ATP getestet wurde.²³ Zwei Peptidarme, bestehend aus jeweils drei Aminosäuren, wurden über Guanidinium-Einheiten und ein aromatisches Gerüst miteinander verknüpft (s. Abbildung 2-9).

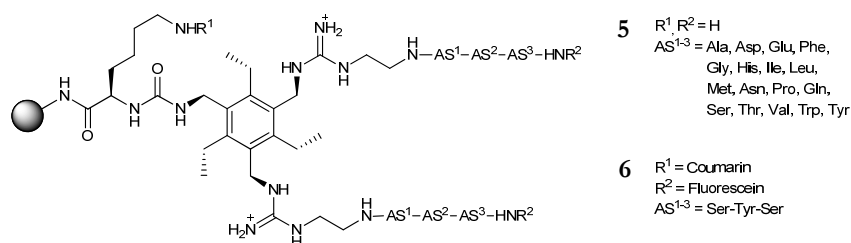


Abbildung 2-9: Rezeptorbibliothek **5** mit 4913 Mitgliedern ($17 \times 17 \times 17 = 4913$) und der fluoreszenzmarkierte Rezeptor **6** mit der Aminosäuresequenz Ser-Tyr-Ser zur Bindung von ATP.

1,3,5-Triaminomethyl-2,4,6-triethylbenzol als aromatisches Gerüst ist so geschaffen, dass die einzelnen Arme sich abwechselnd oberhalb und unterhalb der aromatischen Ebene anordnen und so eine vororganisierte Kavität für bindende Wechselwirkungen schaffen. Die beiden Guanidiniumgruppen wurden eingebaut, um über ionische Wechselwirkungen die Phosphatgruppen des Nukleotids zu binden. Die zwei identischen Peptidarme wurden durch kombinatorische Chemie nach der Split-und-Mix-Methode²⁴ synthetisiert und dienen zur Ausbildung selektiver bindender Wechselwirkungen zum Substrat. Ein dritter Arm dient als Anknüpfungsstelle für die Festphase. Die Mitglieder der Bibliothek wurden an der festen Phase

gebunden in Wasser bei pH 7.1 und Puffer (HEPES-Puffer) mit fluoreszenzmarkiertem ATP auf ihre Bindungseigenschaften getestet. Etwa 15 % der Bibliothek binden ATP. Unter diesen ATP-bindenden Rezeptoren wurden einige ausgewählt, synthetisiert, mit Fluorescein und Coumarin markiert und in Lösung (HEPES-Puffer, pH 7.1) auf ihre Bindungseigenschaften überprüft. Der effektivste Rezeptor **6** mit der Aminosäure-Sequenz Ser-Tyr-Ser bindet ATP mit einer Bindungskonstanten von $3.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, während AMP und GTP weniger stark gebunden wurden. Die Kombination von Serin und Tyrosin in der AS-Sequenz des besten Rezeptors lässt vermuten, dass π - π -Wechselwirkungen zwischen der phenolischen Seitenkette des Tyrosins und Adenin als auch Wasserstoff-Bindungen zwischen der OH-Gruppe des Serins und der Ribose und/oder Adenin eine Rolle bei der Erkennung von ATP spielen.

Waters und Mitarbeiter entwickelten ein aus 12 Aminosäuren bestehendes β -Hairpin Peptid **7** zur Erkennung von Nukleotiden in Wasser (s. Abbildung 2-10).²⁵ Das Peptid **7** bindet ATP in Wasser (Acetat-Puffer, pH 5.0) mit einer Bindungskonstante von $6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, während ADP und AMP schwächer gebunden werden.

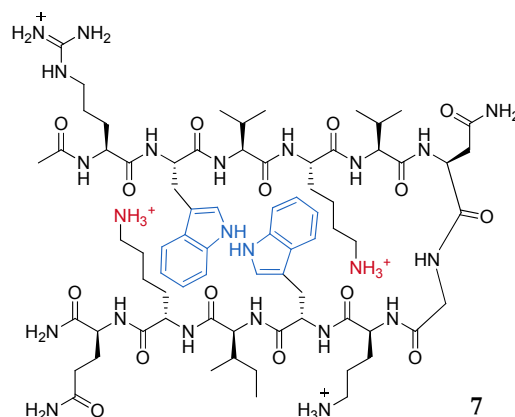


Abbildung 2-10: Struktur des β -Hairpin Peptids **7**. Rezeptor **7** bindet den Adenin-Ring des ATP in einer aromatischen Spalte, die von den zwei Tryptophan-Resten aufgespannt wird. Zusätzlich wird die Bindung durch Wechselwirkungen der Phosphatgruppe mit den zwei Lysin-Resten verstärkt.²⁵

NMR-Studien und Mutation der Aminosäuren Trp und Lys belegen, dass die Erkennung des ATP durch eine Kombination von aromatischen und elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Rezeptor **7** und dem Adenin-Ring und der Phosphatgruppe des ATP stattfindet. Der Adenin-Ring des ATP wird in einer aromatischen Spalte in der Mitte der β -Hairpin-Struktur, die von zwei Tryptophan-Resten aufgespannt wird, gebunden. Die Bindung wird zusätzlich durch Wechselwirkung der negativ geladenen Phosphatgruppe mit den zwei Lysin-Resten verstärkt.

Schmuck und Mitarbeiter entwickelten einen Tweezer-Rezeptor **8** aufgebaut aus zwei peptidischen Armen, die über ein aromatisches Templat verknüpft sind. Die zwei identischen

Arme setzen sich jeweils aus Phenylalanin, Lysin und einer Oxoanion-bindenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Kopfgruppe zusammen (s. Abbildung 2-11).²⁶

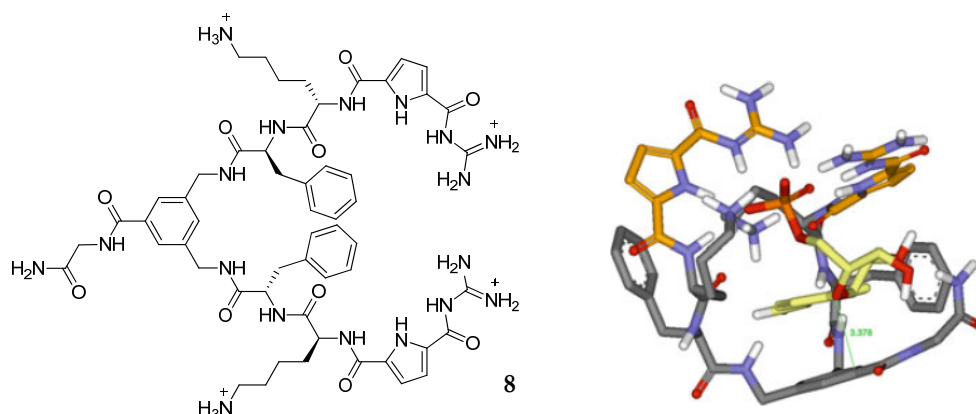


Abbildung 2-11: Links: Struktur des Tweezer-Rezeptors **8**. **Rechts:** NMR-Studien und computergestützte Rechnungen zeigen die entscheidenden ionischen und π -Stapelwechselwirkungen, die für die Bindung verantwortlich sind.²⁶ Reprinted with permission from H. Y. Kuchelmeister, C. Schmuck, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 5311-5318. Copyright 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

UV- und Fluoreszenz-Bindungsstudien in Wasser (Bis-Tris Puffer, pH 7) ergaben, dass Rezeptor **8** 1:1-Komplexe mit Nukleotiden mit einer Stabilität von $K \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$ bildet, während einfache Phosphate mit einer um etwa eine Größenordnung kleineren Bindungsstärke als die Nukleotide (mit Ausnahme von ATP) gebunden werden. ($\text{UMP} > \text{GMP} \approx \text{AMP} > \text{cAMP} \approx \text{CMP} > \text{ADP} > \text{ATP} \approx \text{PPi} \approx \text{P}$). Dies lässt vermuten, dass neben den ionischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphatresten und der Oxoanion-bindenden Einheit und/oder der Lysin-Seitenkette zusätzliche Wechselwirkungen maßgeblich zur Bindung beitragen. Da die Selektivität des Rezeptors **8** nicht signifikant ist (z. B. $K = 9.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ für UMP, $K = 6.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ für CMP) liegt es nahe, dass der Zugewinn an Bindungsstärke durch unspezifische π - oder hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird. NMR-Studien und computergestützte Rechnungen zeigen, dass der Tweezer-Rezeptor eine Kavität formt, in der die beiden Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheiten senkrecht zueinander orientiert sind und auf diese Weise das tetraedrische Phosphat binden. Die Nukleobase liegt parallel in einem Abstand von 3.38 Å über dem aromatischen Ring des Templates und wird über hydrophobe und/oder π -Wechselwirkungen gebunden (s. Abbildung 2-11). Bemerkenswert und auf den ersten Blick unerwartet ist die Bindungsselektivität $\text{AMP} > \text{ADP} > \text{ATP}$ des Rezeptors. Gewöhnlich werden höher geladene Nukleotide bevorzugt gebunden, da zusätzliche ionische Wechselwirkungen zwischen Substrat und Rezeptor ausgebildet werden können. NMR-Messungen und computergestützte Berechnungen belegen, dass Rezeptor **8** eine definierte Kavität mit spezifischen Wechselwirkungen formt, so dass die Phosphatreste je größer sie sind sich außerhalb der Kavität befinden, der konkurrierende Einfluss der umgebenden Wassermoleküle steigt und der Rezeptor die Phosphatreste so weniger effektiv binden kann.

Die ausgewählten Beispiele zur Erkennung von Nukleotiden zeigen deutlich, dass für eine effektive Bindung die Kombination von verschiedenen Arten von nicht-kovalenten Wechselwirkungen innerhalb einer definierten Struktur entscheidend ist für die selektive molekulare Erkennung in Wasser.

2.2 Supramolekulare Erkennung von DNA und RNA

Die DNA (deoxyribonucleic acid, DNS Desoxyribonukleinsäure) und RNA (ribonucleic acid) gehören zu den vier wichtigsten Klassen natürlicher Makromoleküle: Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren. Die DNA ist in allen Prokaryoten und Eukaryoten* Träger der genetischen Information. Viren nutzen entweder DNA oder RNA als genetisches Material. Die RNA spielt eine wichtige Rolle in der Codierung, Decodierung, Regulierung und Expression der Gene. Kleine synthetische Moleküle, die an spezifische DNA-Sequenzen binden, ermöglichen ein Verständnis für die Expression der genetischen Information auf molekularer Ebene und liefern dadurch die Möglichkeit Gene zu stimulieren bzw. zu blockieren. Solche synthetischen Moleküle mit dem Potential zur Kontrolle der Genexpression sind ein entscheidender Schritt hin zur Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Krebs, genetischen oder infektiösen Krankheiten.³ Um künstliche DNA-Liganden zu synthetisieren, ist ein detailliertes Wissen über den Aufbau und die Struktur der DNA als auch die Erkennung der DNA durch Proteine Voraussetzung.

2.2.1 Struktur der DNA und RNA

Die DNA ist ein Polymer bestehend aus vier verschiedenen Bausteinen, den sogenannten Nukleotiden (Desoxyribonukleotide) (s. Kapitel 2.1.2). Jeder dieser Bausteine besteht aus drei Komponenten: einer Phosphatgruppe, einem 2-Desoxyribosezucker und einer Nukleobase. Bei den Basen handelt es sich um die Purine Guanin (G) und Adenin (A) und die Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T). Die Nukleobasen sind mit dem 1'-Ende der 2-Desoxyribose verbunden, an deren 5'-Ende der Phosphatrest hängt. Die Verknüpfung der einzelnen Nukleotide zum Polymer erfolgt über eine Phosphodiester-Bindung zwischen der an der 3'-Position befindlichen OH-Gruppe der Desoxyribose und dem 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers des folgenden Nukleotids (s. Abbildung 2-12). Dadurch besitzt jeder Einzelstrang ein sogenanntes 3'- und ein 5'-Ende. Polymerasen fügen neue Nukleotide immer am 3'-Ende des DNA-Strangs an, der DNA-Einzelstrang wächst also immer vom 5'- zum 3'-Ende und auch die Basensequenzen werden in 5'→3'-Richtung geschrieben.³ Die Abfolge der vier verschiedenen Nukleobasen im DNA-Strang codiert die genetische Information, während die Zucker- und Phosphatgruppen eine strukturelle Aufgabe erfüllen.

* Eukaryoten sind Lebewesen mit Zellkern, während der Begriff Prokaryoten die Lebewesen ohne Zellkern beschreibt.

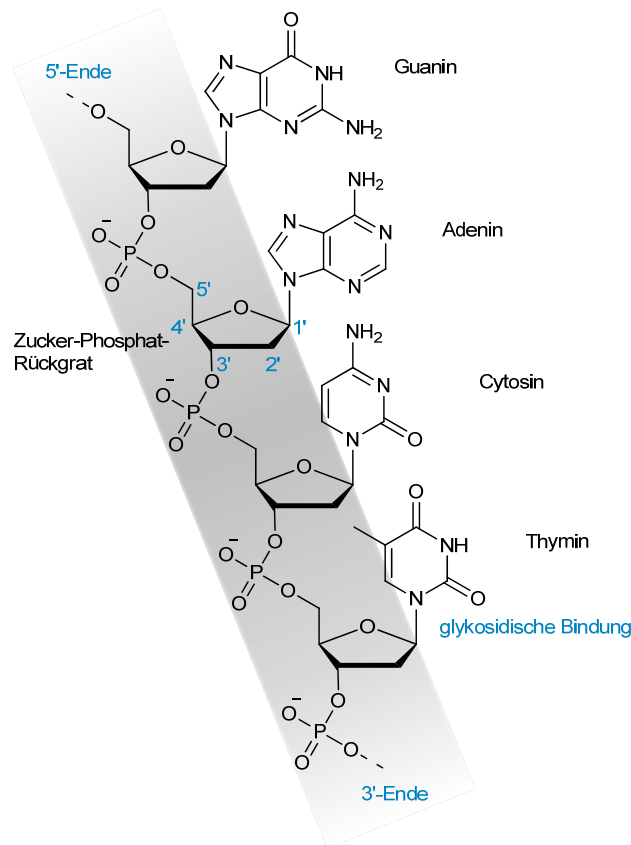


Abbildung 2-12: Ausschnitt aus einem DNA-Einzelstrang.

Im Jahr 1953 konnten *Watson* und *Crick* zum ersten Mal nachweisen, dass die DNA in der Regel nicht als Einzelstrang vorliegt, sondern aus zwei antiparallelen Einzelsträngen besteht, deren Sequenzen komplementär sind (das 3'-Ende des einen Stranges steht dem 5'-Ende des anderen Stranges gegenüber) und die eine schraubenförmige Doppelhelix bilden. Bei dieser Zusammenlagerung stehen sich immer Guanin- und Cytosin-Reste bzw. Adenin- und Thymin-Reste gegenüber und bilden drei bzw. zwei Wasserstoff-Brückenbindungen aus (Abbildung 2-13). Diese Art der Basenpaarung im Doppelstrang der DNA wird als komplementäre oder *Watson-Crick*-Basenpaarung bezeichnet.¹ Das Rückgrat der Helix besteht aus zwei umeinander gewundenen negativ geladenen Phosphatsträngen, deren negativ geladenen Gruppen sich zum umgebenden Wasser hin ausrichten. Zwischen den beiden Phosphatsträngen sind die Basen durch Wasserstoff-Brückenbindungen zu Basenpaaren gepaart, die untereinander über π - π -Stapelwechselwirkungen die Doppelhelix stabilisieren. Eine Konsequenz der *Watson-Crick*-Basenpaarung ist, dass sich die zwei Desoxyribosen eines Basenpaares auf der gleichen Seite des Basenpaares befinden bzw. die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares sich nicht diametral gegenüber stehen. Dies und die Konformation der Zucker hat zur Folge, dass bei der Stapelung der Basenpaare in der Helix zwei unterschiedlich große, die Helix entlangwindende Vertiefungen entstehen. Diese Vertiefungen werden als große und kleine Furche bzw. Haupt- und Nebenfurche bezeichnet (s. Abbildung 2-13).²⁹

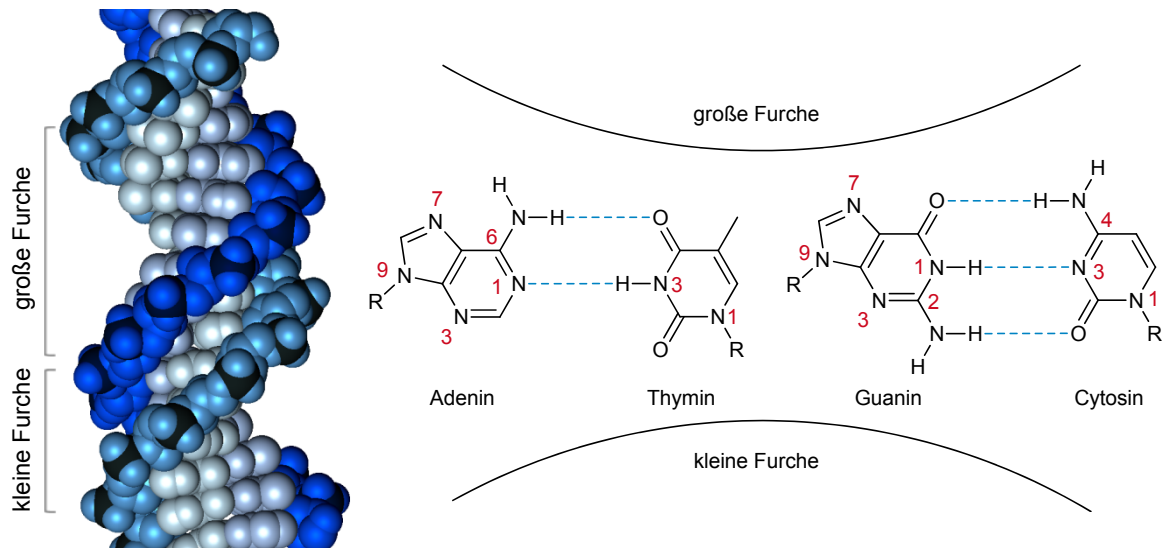


Abbildung 2-13: Links: Struktur der DNA-Doppelhelix (PDB 1N4L). Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist in dunklen Farben, die Basenpaare in hellen Farben dargestellt. **Rechts:** Watson-Crick-Basenpaarung und schematische Darstellung der großen und kleinen Furche. G und A gehören zu den Purinen, T und C zu den Pyrimidinen. Das AT-Basenpaar formt zwei Wasserstoff-Bindungen während das GC-Basenpaar drei formt.

Die Wasserstoff-Brückenbindungen sind hauptsächlich für die Spezifität der Paarung verantwortlich, während die Stabilität der DNA-Doppelhelix fast ausschließlich durch die π - π -Stapelwechselwirkung der Basenpaare bestimmt wird.

Abhängig von der Sequenz und vom umgebenden Medium existieren eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher DNA-Helices.²⁷ Die am häufigsten auftretenden Formen sind die sogenannte B-DNA und A-DNA, die auch als „kanonische DNA“ bezeichnet werden, und die Z-DNA, welche charakteristisch für alternierende Guanin-Cytosin-Sequenzen ist (s. Abbildung 2-14).

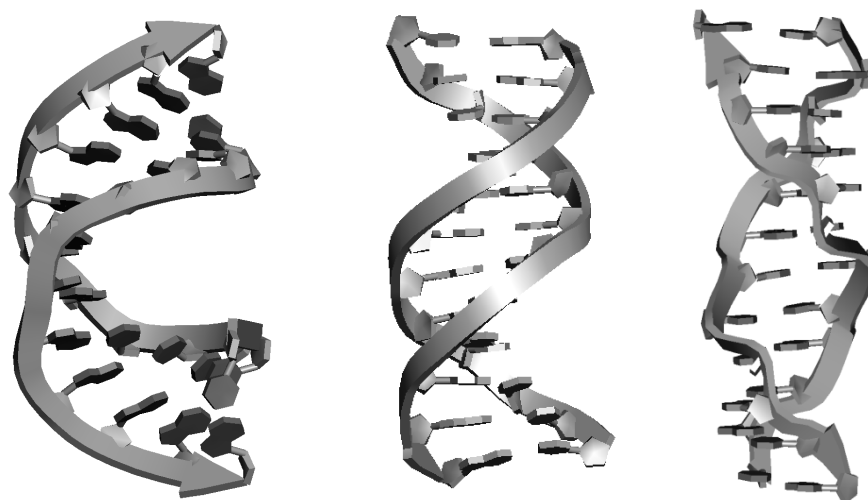


Abbildung 2-14: Von links nach rechts: Strukturmodelle der A-, B- und Z-DNA. A-, B- und Z-DNA sind jeweils mit 12 Basenpaaren dargestellt (PDB 2D47, 1N4L, 3ZNA).

Viele der bisher entdeckten DNA-Strukturen sind Unterformen der B- und A-DNA. Die B-DNA ist unter physiologischen Bedingungen die vorherrschende Form in biologischen Systemen. A-DNA und Z-DNA wurden kristallographisch zwar beobachtet, besitzen jedoch vermutlich eine geringere biologische Relevanz. Bei B-DNA handelt es sich um eine rechtsdrehende Helix mit einem Durchmesser von etwa 2 nm, 10 Basenpaaren und einem Anstieg von 3.4 nm pro Windung und zwei unterschiedlich großen Furchen, in denen die Basen direkt an der Oberfläche liegen und in direktem Kontakt zum Lösemittel stehen (s. Abbildung 2-14 und Tabelle 2-1).²⁸ Die Basen in der großen Furche sind dementsprechend besser zugänglich. Große Moleküle, wie Proteine, binden daher an die große Furche, während die meisten künstlichen DNA-Rezeptoren mit den Basenpaaren in der kleinen Furche wechselwirken. Die strukturelle Umwandlung von B-DNA zu A-DNA ist von der relativen Feuchtigkeit und Salzkonzentration der Umgebung abhängig. B-DNA liegt bei einer relativen Feuchtigkeit von etwa 95 % vor. Sobald diese auf 75 % sinkt, findet eine reversible Konformationsänderung von B- zu A-DNA statt. Andere DNA-Formen können über eine fein abgestimmte Kontrolle dieser Bedingungen (z. B. C-DNA) oder durch definierte Polynukleotid-Sequenzen (z.B. D- und Z-DNA) erhalten werden. Die A-Form der DNA wird nicht nur bei einer geringen Feuchtigkeit der Umgebung gebildet, sondern spielt auch eine Rolle in RNA-DNA-Hybriden, während der DNA-Transkription und Replikation. Die A-DNA ist wie die B-DNA eine rechtsdrehende Doppelhelix besitzt aber, wie in Tabelle 2-1 zu sehen, im Vergleich mehr Basenpaare pro Windung. Dies führt zu einem engeren Drehwinkel und somit zu einer Vertiefung der großen Furche und einer Abflachung der kleinen Furche.²⁹ Die Z-DNA - ihr Name leitet sich vom zickzackförmigen Verlauf des Zucker-Phosphat-Rückgrates ab - ist im Gegensatz zu den beiden anderen Konformationen linksgängig. Ihre Struktur wiederholt sich alle zwei Basenpaare, die kleine Furche ist eng und tief während die große Furche sehr breit und eher konvex ist (s. Abbildung 2-14 und Tabelle 2-1).¹⁵

Strukturmerkmal	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Drehsinn der Helix	rechts	rechts	links
Durchmesser	≈ 2.6 nm	≈ 2.0 nm	≈ 1.8 nm
Basenpaare pro helikaler Windung	11.6	10.0	6.0
Helikale Windung pro Basenpaar (twist)	32.7°	36°	50°
Ganghöhe (Anstieg pro Windung)	3.4 nm	3.4 nm	4.4 nm
Anstieg pro Base	0.25 nm	0.34 nm	0.73 nm
Große Furche	eng und tief (Weite 0.22 nm Tiefe 1.30 nm)	breit und tief (Weite 1.16 nm Tiefe 0.85 nm)	flach (Weite 0.88 nm Tiefe 0.37 nm)
Kleine Furche	breit und flach (Weite 1.11 nm Tiefe 0.26 nm)	eng und tief (Weite 0.60 nm Tiefe 0.82 nm)	eng und tief (Weite 0.20 nm Tiefe 1.38 nm)
Zuckerkonformation	C3'-endo	C2'-endo	Pyrimidinbasen: C2'-endo Purinbasen: C3'-endo
glykosidische Bindung	anti	anti	Pyrimidinbasen: anti Purinbasen: syn

Tabelle 2-1: Vergleich der Strukturinformationen der drei DNA-Konformationen A-DNA, B-DNA und Z-DNA.^{27,29}

Da die Z-DNA jedoch eine metastabile Konformation ist, wird sie nur unter bestimmten Umständen, wie z. B. bei alternierenden Purin-Pyrimidin-Sequenzen (besonders im Falle von poly(dGC)₂) oder hohen Salzkonzentrationen (> 2.5 M NaCl), eingenommen.^{29,30}

Die bisher beschriebenen Basisstrukturen der DNA können sich zu weiteren Strukturen höherer Ordnung zusammenlagern. In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in Form von dicht gepackten sogenannten Chromosomen vor. Zur Bildung eines Chromosoms windet sich die DNA-Doppelhelix unter Bildung einer zylindrischen Struktur um sogenannte Histone (bestehend aus acht Proteinen) und bildet ein Nucleosom mit einem Durchmesser von 11 nm. Dieses durchläuft wiederum weitere Packungsschritte bis zum Chromosom. Quadruplex-DNA-Strukturen kommen in sogenannten Telomer-Strukturen vor, zu denen die DNA am Ende eines Strangs zusammen gepackt vorliegt. Ebenso wurden Triplex-Strukturen in bestimmten DNA-Regionen gefunden. Verzweigte oder kreuzförmige DNA (z. B. *Holliday*-Strukturen) wird während Replikations- oder Reparaturprozessen gebildet.

Während die DNA der Träger der Erbinformation ist, ist die RNA für die Umsetzung der genetischen Information in Proteine zuständig und fungiert z. B. in der Rolle der mRNA (Messenger-RNA) als Informationsüberträger. Neben der mRNA übernehmen weitere RNA-Typen zusätzliche Aufgaben. Auch im Falle der RNA sind die Nukleobasen an Zucker gebunden und über Phosphodiester-Bindungen miteinander verknüpft. Die vier Basen, die die RNA verwendet, sind Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und die vierte Base ist - im Unterschied zur DNA - Uracil (U). Das entsprechende Nukleosid wird als Uridin bezeichnet. Der verwendete Zucker ist keine 2-Desoxyribose wie im Falle der DNA, sondern eine Ribose, die noch über die OH-Gruppe an der 2'-Position verfügt (s. Abbildung 2-15).

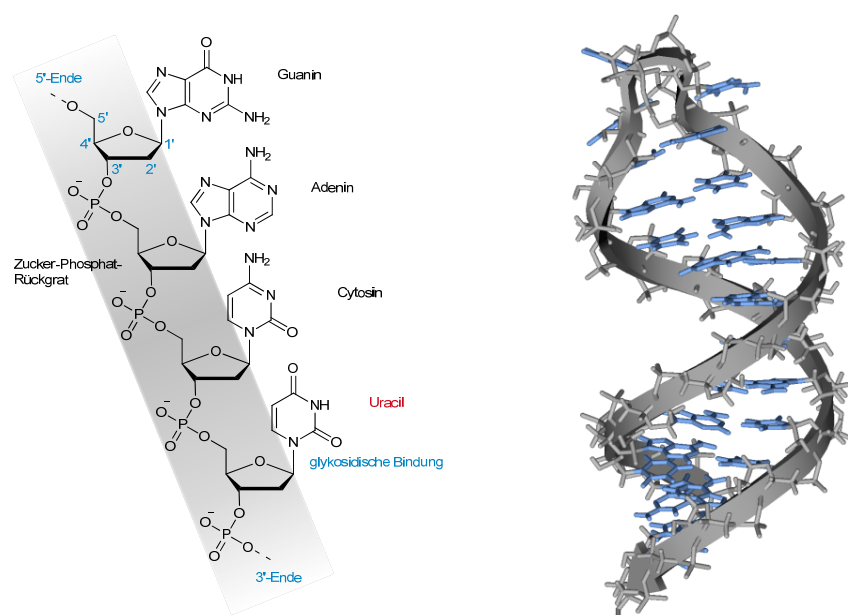


Abbildung 2-15: Links: Verknüpfung der Basen (C, G, A und U) über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat zur RNA. **Rechts:** Intramolekular hybridisierter DNA-Einzelstrang (Hairpin-Struktur) (PDB 1YSV).³¹

Die RNA ist ein Polynukleotid, welches aber im Gegensatz zur DNA häufig als intramolekular hybridisierter Einzelstrang vorliegt, der komplexere dreidimensionale Strukturen wie Hairpin-, Stemloop-, Loop- und Helix-Strukturen aufweist. Die RNA kann aber auch als Doppelstrang vorliegen. In diesem Fall weist sie die typischen Merkmale der A-DNA (antiparallele Anordnung der Stränge, rechtsgängig, 11 Basenpaare pro Windung) oder bei hohen Salzkonzentrationen von über 20 % Merkmale der A'-DNA (antiparallele Anordnung der Stränge, 12 Basenpaare pro Windung, Ganghöhe 3 nm, Neigungswinkel zur Helixachse 16° bis 19°) auf.^{32,33} Beide Formen weisen eine sehr tiefe und enge große Furche und eine flache, weite kleine Furche auf.

Aufgrund des Aufbaus und der Struktur sowohl der DNA als auch der RNA kann ihre molekulare Erkennung auf unterschiedlichen Wegen stattfinden. Die Erkennung der Doppelhelixstruktur findet in den meisten Fällen auf einem der drei folgenden Wege oder durch Kombinationen aus diesen statt:

- Wechselwirkung mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat
- Erkennung der DNA-Furchen (kleine und große Furche)
- Interkalation zwischen den Basenpaaren

Weitere Möglichkeiten der Erkennung der DNA sind die folgenden:

- kovalente Bindung an die DNA-Basen
- Metallkoordination an die Basen
- Erkennung komplexer DNA-Strukturen (wie z. B. nukleosomaler DNA, Triplex-, Quadruplex- oder *Holliday*-Strukturen)

2.2.2 Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat

Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA lässt sich als polyanionisches lineares Polymer beschreiben. Die Hydroxylgruppe des verbrückenden Phosphats im Rückgrat der DNA hat einen $pK_s < 1$, so dass bei pH 7 alle Phosphatgruppen negativ geladen sind. Damit die Struktur der DNA in wässriger Lösung stabil bleibt, werden Metallkationen zur Ladungskompensation gebunden. Aufgrund der harten sauerstoffreichen Oberfläche finden bevorzugt Wechselwirkungen mit den Metallkationen der ersten und zweiten Gruppe statt. Die Bindung von monovalenten Kationen wurde 1970 von *Manning* als sogenannte Gegenion-Kondensation („counter-ion-condensation“) beschrieben.³⁴ Die Kationen binden nicht an bestimmte Stellen des Rückgrats, sondern halten sich innerhalb weniger Ångström um die DNA-Oberfläche auf. Sie behalten ihre innere Hydratationsschicht, können sich aber frei entlang der Helix bewegen. B-DNA kondensiert 0.76-0.88 monovalente Gegenionen pro Phosphatgruppe. Durch die Kondensation der Gegenionen wird die effektive negative Ladung der DNA reduziert und

somit das Lösungsverhalten, die Bindung anderer geladener Moleküle und Proteine sowie die Stabilität beeinflusst. Die Bindung von Substraten ist z. B. stark abhängig von der Salzkonzentration der Lösung. Untersuchungen zu Wasser-DNA-Wechselwirkungen am sogenannten *Dickerson-Drew* Dodecamer²⁸ (d(CGCGAATTCGCG)₂) haben ergeben, dass durchschnittlich drei Wassermoleküle pro Phosphat gebunden werden. In der großen Furche bilden 19 Wassermoleküle die erste Hydratationsschicht um die Stickstoff- und Sauerstoffatome der Basen. Die zweite Hydratationsschicht wird durch ein Netzwerk von weiteren 36 Wassermolekülen geformt. In der kleinen Furche bilden Wassermoleküle ein zickzack-artiges Netzwerk, welches als „spine of hydration“ bezeichnet wird (s. Abbildung 2-16 links).

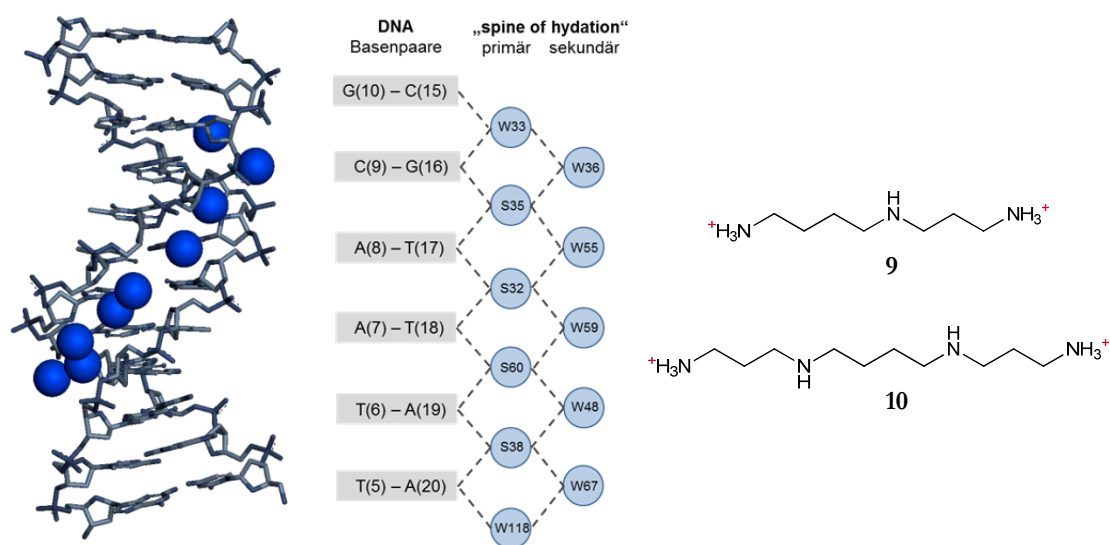


Abbildung 2-16: Links: Kristallstruktur des *Dickerson-Drew* Dodecamer mit einer Auswahl von Wassermolekülen in der kleinen Furche, die das sogenannte „spine of hydration“ bilden. Die Wassermoleküle sind als blaue Kugeln schematisch dargestellt (PDB 2BNA). **Rechts:** Strukturen der an die DNA-Außenkanten bindenden Polyamine Spermidin (9) und Spermin (10). Die Bindung der Polyamine an das Rückgrat der DNA erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen.

Die erste Schicht von Wassermolekülen bildet Wasserstoff-Bindungen zu O(2) des Thymins und N(3) des Adenins aus, so dass jedes Wassermolekül die beiden Stränge des Dodecamers verbrückt. Die hoch geordnete zweite Hydratationsschicht umgibt die erste Schicht und sorgt für deren zusätzliche Vernetzung.^{29,35} Aus diesem Grund werden insbesondere bei der Bindung in die DNA-Furchen Kationen und Wassermoleküle in das umgebende Lösemittel freigesetzt. Der Bindungsvorgang in die Furchen ist somit in Bezug auf die Freisetzung der Kationen und Wassermoleküle entropisch begünstigt.^{36,37} Klassische Beispiele für Moleküle, die an das DNA-Rückgrat binden sind Polyamine wie Spermidin (9) und Spermin (10) (s. Abbildung 2-16 rechts). Die Bindung ist unspezifisch und erfolgt hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen. Polyamine sind allgegenwärtig in eukaryotischen Zellen und spielen

wichtige Rollen z. B. bei der Packung von DNA oder der Zell-Proliferation^{* 38,39}. In der Regel finden sich kaum natürliche oder synthetische Verbindungen, deren Wechselwirkung mit der DNA sich ausschließlich auf ionische Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat beschränken. Die Bindung an die DNA erfolgt üblicherweise in Kombination mit Interkalation zwischen die Basenpaare oder durch spezifische Wechselwirkungen mit den Kanten der Basenpaare in den Furchen. Dennoch leisten ionische Wechselwirkungen einen maßgeblichen Beitrag zur Bindung und spielen eine entscheidende Rolle bei der Annäherung an die DNA. Dementsprechend beinhaltet die Bindung von Proteinen an die DNA üblicherweise auch Wechselwirkungen mit dem DNA-Rückgrat. Diese Wechselwirkungen beschränken sich auf elektrostatische Wechselwirkungen von kationischen Resten der Aminosäuren, wie z. B. Arginin, die Wasserstoff-Bindungen mit den Phosphat-Sauerstoffen bilden können. Diese Art der Wechselwirkung mit dem DNA-Rückgrat ist nur ein Teil der entscheidenden Wechselwirkungen, der zur DNA-Erkennung beiträgt. Den Hauptbeitrag, besonders in Bezug auf die selektive Bindung, liefern Erkennungsmotive für die kleine und große Furche.

2.2.3 Erkennung der großen Furche der DNA

Erkennung der großen Furche durch Proteine

Die DNA-Erkennung durch Proteine erfolgt in der Regel durch Bindung des Proteins in und um die große Furche. Der Grund hierfür liegt nicht nur in ihrer relativen Größe und Form, sondern auch am Vorhandensein einer großen Zahl von verschiedenen Wasserstoff-Brücken-Donoren und Akzeptoren, an die das Protein binden kann. Typische Bindungsmotive bestehen aus zylindrischen Einheiten gebunden an α -Helices, deren Größe und Form der großen Furche entspricht, für die kleine Furche aber zu groß sind. Von der Natur genutzt Motive sind z. B. Helix-Turn-Helix-Strukturen, Zink-Finger und Leucin-Zipper (s. Abbildung 2-17).⁴⁰

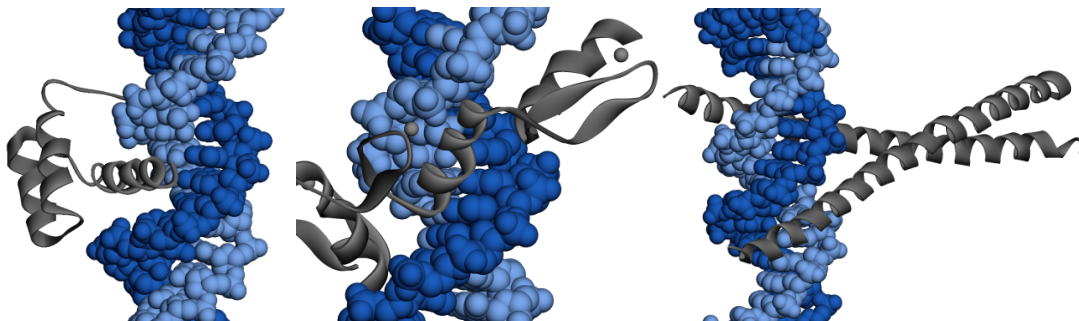


Abbildung 2-17: Repräsentative helicale DNA-Bindungsmotive der Natur und ihr Docking in die große Furche der DNA. Von links nach rechts: Helix-Turn-Helix-Motiv (PDB 1HDD)⁴⁴, Zink-Finger-Motiv (PDB 1A1J)⁴¹ und Leucin-Zipper-Motiv (PDB 1YSA)⁴².

* Zell-Proliferation bezeichnet das schnelle Wachstum und die Vermehrung von Gewebe, durch Zellwachstum und Zellteilung (z. B. bei Gefäßverletzungen).

Aminosäuren, die neben der α -Helix zur Bindung an die DNA-Basen beitragen, sind unter anderem Arginin, Histidin, Lysin, Serin, Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure. Ebenso können auch verbrückende Wassermoleküle zwischen der Proteinoberfläche und den DNA-Basen zum bindenden Netzwerk der Wasserstoff-Brücken beitragen (s. Abbildung 2-18).^{43,40}

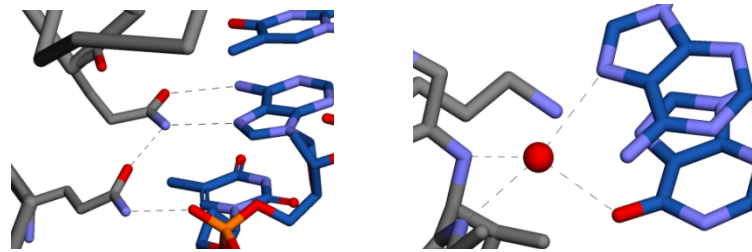


Abbildung 2-18: Protein-DNA Wechselwirkungen. **Links:** Bidentate Wechselwirkungen zwischen Glutamin und Adenin des λ -Repressor-Komplex (Helix-Turn-Helix-Protein). Zusätzlich zur Wechselwirkung mit Adenin besteht eine weitere Wasserstoff-Bindung zu einer weiteren Glutaminseitenkette, welche wiederum mit einer Phosphatgruppe wechselwirkt (PDB 1LMB). **Rechts:** Durch ein Wassermolekül verbrückte Protein-DNA-Wasserstoff-Bindungen im Trp-Repressor-Komplex (Helix-Turn-Helix-Protein) (PDB 1TRR).

Da verschiedene Aminosäuren an verschiedene Basen in unterschiedlichen Strukturen binden, ist es nicht möglich, eine bestimmte Aminosäure bzw. Aminosäuren-Sequenz zu bestimmen, die ausschließlich oder hauptsächlich eine bestimmte Base bindet. Strukturelle Studien von DNA-Protein-Komplexen deuten darauf hin, dass die Natur keinen festen Code für Protein-DNA-Wechselwirkungen zu nutzen scheint.⁴⁴

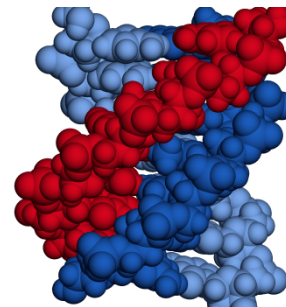
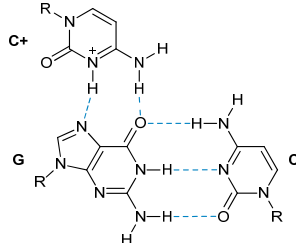
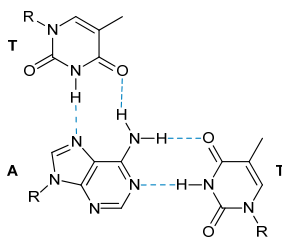
Aufgrund der Komplexität der Bindung von Proteinen an die DNA ist es so gut wie unmöglich, synthetische *de novo* Peptide für die DNA-Bindung zu entwerfen. Bisher konnte kein allgemeingültiger Erkennungscode für DNA-Basenpaare basierend auf Aminosäuren entwickelt werden. Andere Möglichkeiten zur peptidischen DNA-Erkennung sind die Synthese künstlicher Peptide durch Veränderung⁴⁵ oder Kombination von Bindungsmotiven und Peptideinheiten, deren Sequenzspezifität bekannt ist. Ein effektiverer Ansatz wäre die Synthese einer Bibliothek von Peptiden, die es durch Selektion und Weiterentwicklung ermöglicht, die Sequenzen mit den besten Bindungseigenschaften zu ermitteln.⁴⁶ Auf diesem Ansatz beruhende erfolge konnten z. B. mit synthetischen Peptiden, deren Sequenzen auf modifizierten Zink-Finger-Domänen beruhen, erzielt werden. Ein entwickeltes Zink-Finger-Protein mit den folgenden Aminosäuren in Schlüsselpositionen (Domäne 1: Gln₁Ser₂Asp₃Arg₆, Domäne 2: Arg₁Asp₂Glu₃Arg₆, Domäne 3: Arg₁Asp₂His₃Arg₆) bindet selektiv die DNA Sequenz 5'-GGG-GCG-GCT-3' mit einer Bindungskonstante von $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$.⁴⁷

Erkennung der großen Furche durch Oligonukleotide

Die zweite große Klasse von Molekülen, die in der Lage ist, DNA durch Bindung an die große Furche zu erkennen, sind die Oligonukleotide.^{48,49} Die Bindung erfolgt über Wasserstoff-

Brücken an die Seiten der sich in der großen Furche befindlichen Purinbasen (A und G). Diese Art der Bindung wird als *Hoogsteen* oder reverse *Hoogsteen*-Paarung bezeichnet (s. Abbildung 2-19 links) und kann nur erfolgen, wenn die DNA eine ausgedehnte Sequenz von G und A aufweist. Durch die Bindung an eine solche Sequenz erfolgt die Bildung einer sogenannten Triplex-DNA (s. Abbildung 2-19 rechts).

Hoogsteen-Paarung



Reverse *Hoogsteen*-Paarung

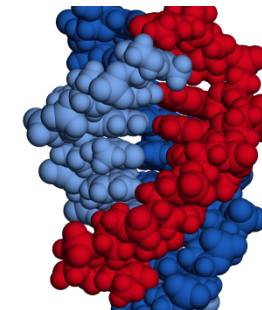
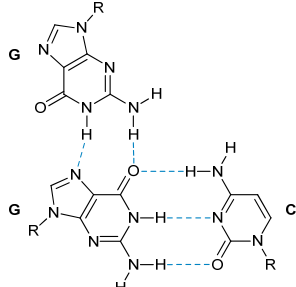
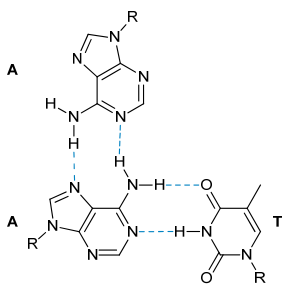


Abbildung 2-19: Links: Wasserstoff-Bindungen der *Hoogsteen* (Pyrimidin-Purin-Pyrimidin, T bindet AT und C⁺ bindet GC) und reversen *Hoogsteen*-Paarung (Purin-Purin-Pyrimidin, G bindet GC und A bindet AT) in der großen Furche ermöglichen die Bildung einer Triplex-Helix. **Rechts:** Die jeweilige NMR-Struktur der *Hoogsteen* und reversen *Hoogsteen*-DNA-Triplex. Die Stränge der *Watson-Crick*-Basenpaare sind blau gefärbt, der zusätzliche Strang in der großen Furche ist rot eingefärbt (PDB 149D⁵⁰ und 134D⁵¹).

Die *Hoogsteen* bzw. reverse *Hoogsteen*-Paarung ermöglicht folgenden Code zur spezifischen Erkennung der DNA-Basenpaare: T bindet AT, C⁺ bindet GC, G bindet GC und A bindet AT.⁵² Da die Erkennung sequenzspezifisch ist, kann die Bindung von Oligonukleotiden an die DNA zur Regulierung der Genexpression genutzt werden.^{53,54} Allerdings binden Oligonukleotide nicht selektiv DNA sondern auch RNA und bilden RNA-DNA-Helices. Elektrostatisch ungünstig bei der Bildung der Triplex-DNA mit einem Oligonukleotid sind die jeweils negativ geladenen polyanionischen Rückgrate der DNA und des Polynukleotids, die durch die *Hoogsteen*-Paarung eng zueinander gebracht werden. *Nielsen et al.* synthetisierten ein neutrales Oligonukleotid, dessen ursprüngliches Zucker-Phosphat-Rückgrat durch ein Polyamid-Rückgrat ersetzt wurde (s. Abbildung 2-20 links).⁵⁵ Diese sogenannten Peptid-Nukleinsäuren (PNA, peptide nucleic acid) sind in der Lage, die DNA-Doppelhelix in Form einer (DNA)₂(PNA)-Triplex zu binden. Es wurde jedoch festgestellt, dass in der Regel die Doppelhelix in ihre Einzelstränge zerlegt wird und zwei PNA-Stränge mit einem einzelnen DNA-Strang eine noch stabilere (DNA)(PNA)₂-Triplex bilden. Während ein PNA-Strang über

Watson-Crick-Paare einen DNA-Strang bindet, bindet der zweite PNA-Strang an die große Furche der PNA-DNA-Helix (s. Abbildung 2-20 rechts).

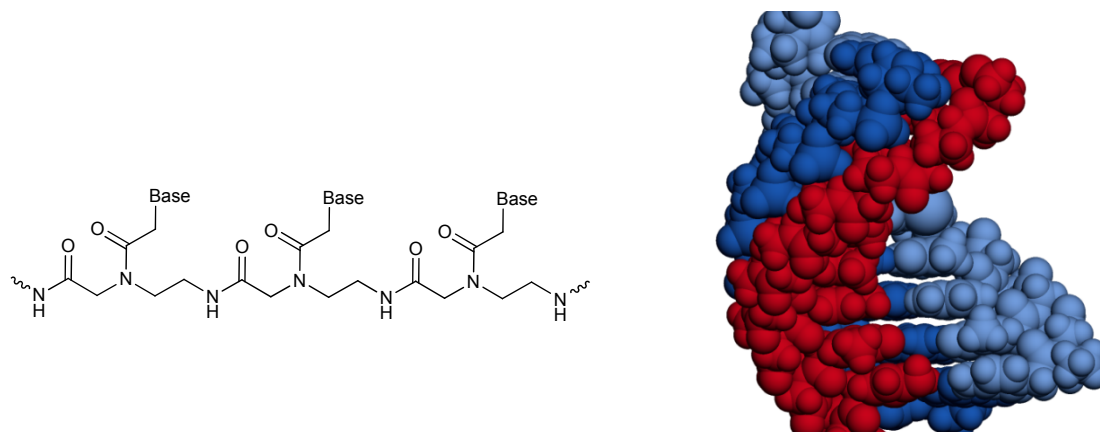


Abbildung 2-20: Links: Generelle Struktur von PNA (peptide nucleic acid). **Rechts:** Erkennung eines DNA-Strangs (dunkelblau) durch zwei PNA-Einheiten. Es bildet sich eine (DNA)(PNA)₂-Triplex. Der *Watson-Crick*-Strang ist hellblau, der *Hoogsteen*-Strang ist rot gefärbt (PDB 1PNN).⁵⁶

Die bisher beschriebenen Moleküle, Peptide und Oligonukleotide, die an die große Furche binden, sind natürliche oder semi-synthetische Biomoleküle. Kleinere natürliche und synthetische Moleküle binden, mit wenigen Ausnahmen, an die kleine Furche oder als sogenannte Interkalatoren zwischen den Basenpaaren.

2.2.4 Erkennung der kleinen Furche

Die kleine Furche eignet sich aufgrund ihrer engen und tiefen Struktur hervorragend für die Wechselwirkung mit kleinen Molekülen, die in der Lage sind, mit den geladenen Phosphaten an den Rändern der Furche, den Zuckerstrukturen an den Seitenwänden der Furche als auch mit den Wasserstoff-Brücken-Donoren und Akzeptoren am Boden der Furche wechselwirken zu können (s. Abbildung 2-21 links). Die Wasserstoff-Brücken-Donoren und Akzeptoren befinden sich an den Rändern der Basenpaare wie in Abbildung 2-21 zu sehen. Die Kreise mit Punkten repräsentieren die freien Elektronenpaare von N(3) der Purine und O(2) der Pyrimidine während die Kreise, die ein H enthalten, für die Wasserstoffatome der 2-Amino-Gruppe am Guanin stehen (s. Abbildung 2-21 rechts).⁵⁷

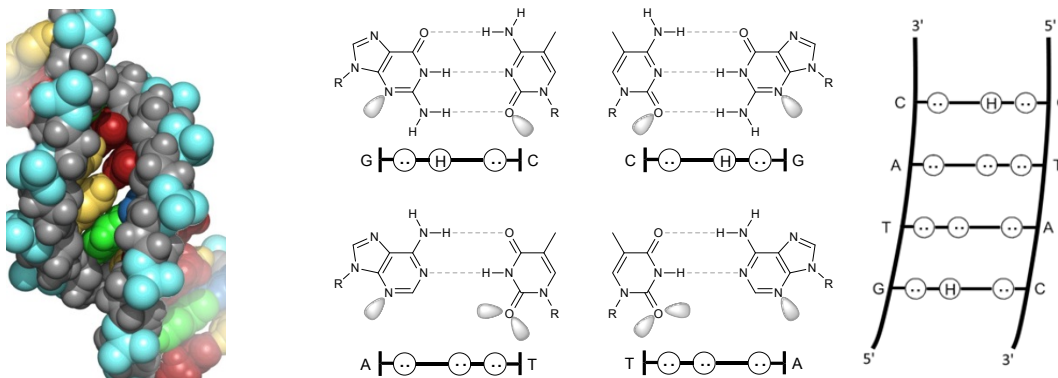


Abbildung 2-21: Molekulare Erkennung der kleinen Furche der DNA. **Links:** Struktur der kleinen Furche. Geladene Phosphate an den Rändern der Furche sind hellblau, Zuckerstrukturen an den Seitenwänden grau, und Wasserstoff-Brücken-Donoren und -Akzeptoren am Boden der Furche bunt dargestellt. **Rechts:** Schematische Darstellung der Wasserstoff-Donoren (Kreis mit H) und Wasserstoff-Akzeptoren (Kreis mit Punkten) der Basenpaare, die sich am Boden der kleinen Furche befinden.⁵⁷

Erkennung der kleinen Furche durch Proteine

Obwohl die Erkennung der DNA durch Proteine, insbesondere die Sequenzerkennung, hauptsächlich über die Bindung an die große Furche erfolgt, ist auch die Bindung an die kleine Furche von Bedeutung.^{3,29} Wechselwirkungen zwischen Proteinen und kleiner Furche finden in der Regel über β -Faltblatt-Strukturen statt, da α -Helices zu groß sind, um in die kleine Furche zu binden. Das sogenannte TATA-Box Protein nutzt große β -Faltblatt-Strukturen, um in die kleine Furche zu binden (s. Abbildung 2-22).^{58,59}

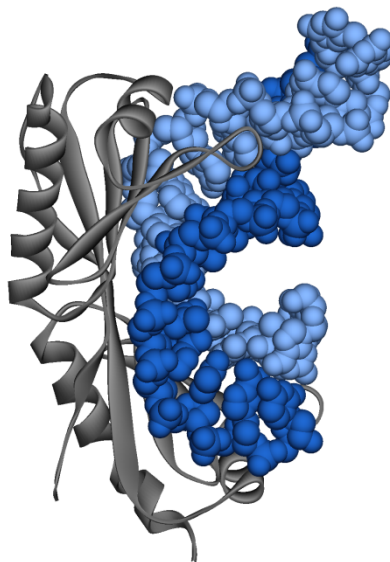


Abbildung 2-22: Die Bindung des TATA-Box bindenden Proteins verursacht durch die Erkennung der kleinen Furche ein Entwinden und Verzerren der DNA (PDB 1YTB).

Während die Erkennung der großen Furche durch α -Helix-Strukturen mit einem moderaten Grad an DNA-Beugung von statten geht, verursacht die Bindung der β -Faltblatt-Regionen des TATA-Proteins in die kleine Furche ein starkes Entwinden und Verzerren der DNA. Die

Entwindung und Verzerrung, die durch die Bindung verursacht wird, ermöglicht die Wechselwirkung der konkaven Oberfläche des Proteins mit den Kanten der Basenpaare, die ansonsten unzugänglich in der kleinen Furche verborgen wären. Die Wechselwirkung der einzelnen Aminosäuren mit den Basenpaaren der DNA, z. B. die Wechselwirkung von Arginin und O(2) von T, ähneln den Bindungen zwischen synthetischen Molekülen und DNA.

Erkennung der kleinen Furche durch kleine natürliche und synthetische Moleküle

Sowohl natürliche als auch synthetische Moleküle, die in die kleine Furche binden, werden mittlerweile in der Medizin unter anderem zur Behandlung von Krebs, Protozoeninfektionen* und als anti-virale und anti-bakterielle Medikamente eingesetzt. Abbildung 2-23 zeigt einige natürliche Moleküle (Chromomycin **11**⁶⁰, Actinomycin D **12**⁶¹, Calicheamicin **13**^{62,63}, Netropsin **14**⁶⁴, Distamycin **15**) und eine Auswahl synthetischer Diarylamidine (DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) **16**, Berenil **17**, Pentamidin **18**) und Bisbenzimidazole (Hoechst 33258 **19**), welche an die kleine Furche der DNA binden.

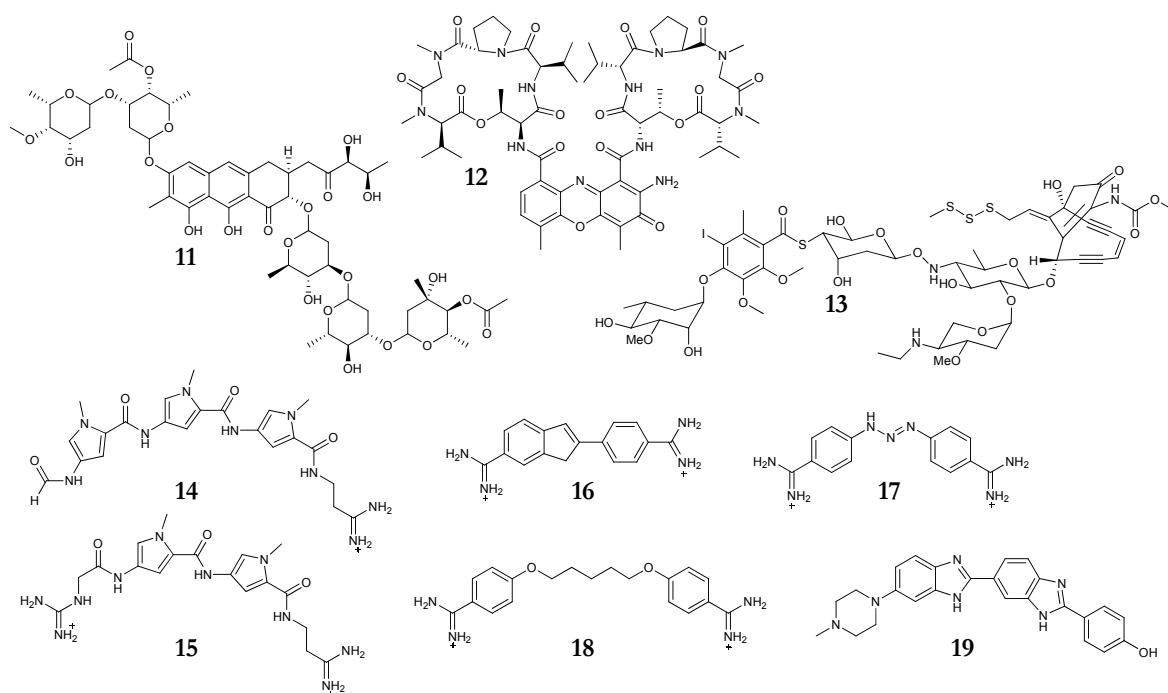


Abbildung 2-23: Natürliche und synthetische Moleküle, die an die kleine Furche binden. Chromomycin (**11**), Actinomycin D (**12**), Calicheamicin (**13**), Netropsin (**14**), Distamycin (**15**), DAPI (**16**), Berenil (**17**), Pentamidin (**18**), Hoechst-33258 (**19**).

Alle hier gezeigten künstlichen DNA-Rezeptoren **16-19** binden bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der kleinen Furche. Der Grund für die Bevorzugung der AT-reichen Sequenz gegenüber der GC-reichen Sequenz ist vermutlich das Vorhandensein der sterisch hindernden

* Protozoen sind tierische Einzeller. Ihr aktives oder passives Eindringen in einen Organismus, ihre Vermehrung und die darauf folgende Reaktion bezeichnet man als Protozoeninfektion oder auch Protozoonose.

N(2)-Aminogruppe des Guanins sowie die etwas breitere kleine Furche GC-reicher Regionen. Die N(2)-Aminogruppe des Guanins verursacht die Destabilisierung der Bindung während die etwas breitere kleine Furche verhindert, dass schmale Moleküle wie z. B. DAPI (16) oder Netropsin (14) ausreichend starke Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Wänden der Furche aufbauen können (s. Abbildung 2-24 links).⁶⁴

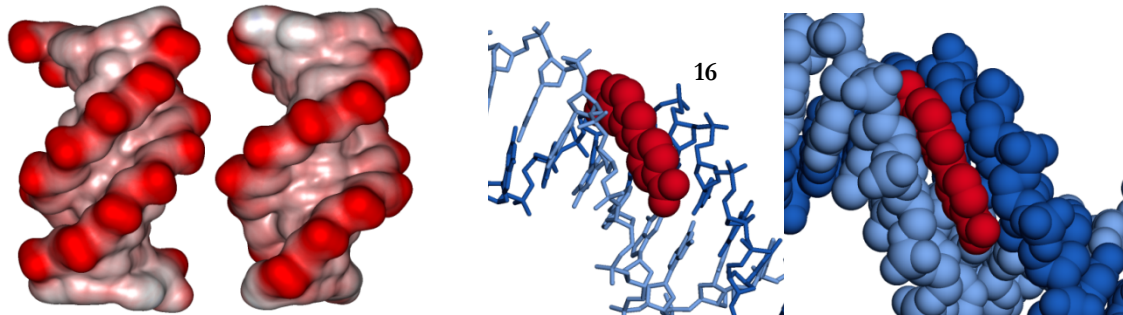


Abbildung 2-24: Links: Oligonukleotid-Kristallstrukturen der Sequenzen $d(CGCAAATTTTC)_2$ und $d(CCGGCGCCGG)_2$ dargestellt mit elektrostatischen Oberflächenpotential. Es sind jeweils deutlich die enge AT-reiche kleine Furche im Zentrum der Sequenz bzw. die breitere GC-reiche kleine Furche zu erkennen (PDB 1D65, PDB 1CGC). **Rechts:** Illustration von gebundenem DAPI (16) in der kleinen Furche der DNA. Die raumfüllende Illustration zeigt den passgenauen Sitz des Moleküls zwischen den Seitenwänden der engen und tiefen kleinen Furche AT-reicher Regionen (PDB 1D30).⁶⁵

DAPI (16) wird als blauer Fluoreszenz-Marker für chromosomale DNA genutzt. Abbildung 2-24 zeigt die Bindung von DAPI in der kleinen Furche. Das Molekül fügt sich passgenau in die enge kleine Furche, die Phenyl- und Indol-Ringe liegen parallel zu den Furchenwänden und erstrecken sich über die Sequenz der drei Basenpaare ATT. Der Stickstoff des Indol-Rings bildet zwei Wasserstoff-Brückenbindungen zum O(2) des Thymins und die geladenen Amidgruppen formen Wasserstoff-Brücken zum N(3) des Adenins. Wasserstoff-Bindungen und Van-der-Waals- bzw. π - π -Stapelwechselwirkung leisten einen Beitrag zur Bindungsstärke, sind aber auch entscheidend für die Positionierung und Selektivität des Moleküls. Zusätzlich wird die Bindungsstärke durch die elektrostatische Anziehung zwischen den kationischen Amidinen und dem polyanionischen Phosphat-Rückgrat verstärkt.⁶⁵ Die Kombination aus strukturellen und elektronischen Faktoren trägt somit sowohl zur Sequenzspezifität als auch zur Bindungsstärke bei. Verschiedene Studien belegen, dass der entscheidende Beitrag zur Bindung vermutlich durch die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu Stande kommt.^{66,67} Zusätzliche Experimente zeigen, dass eine erhöhte Anzahl an positiven Ladungen die Bindungsstärke nicht signifikant verstärkt während, eine Erhöhung der Kontakte mit den Wänden der Furche die Bindungsaffinität steigert.⁶⁸

Abbildung 2-25 zeigt die Bindung von Berenil (17)⁶⁹, Pentamidin (18)⁷⁰ und Höchst-33258 (19)⁷¹ an AT-reiche Sequenzen der kleinen Furche. Die Bindung erfolgt wie bei DAPI beschrieben in der Regel durch Nutzung von Wasserstoff-Brückenbindungen zu den

Basenpaaren, π - und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Seitenwänden und elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat.

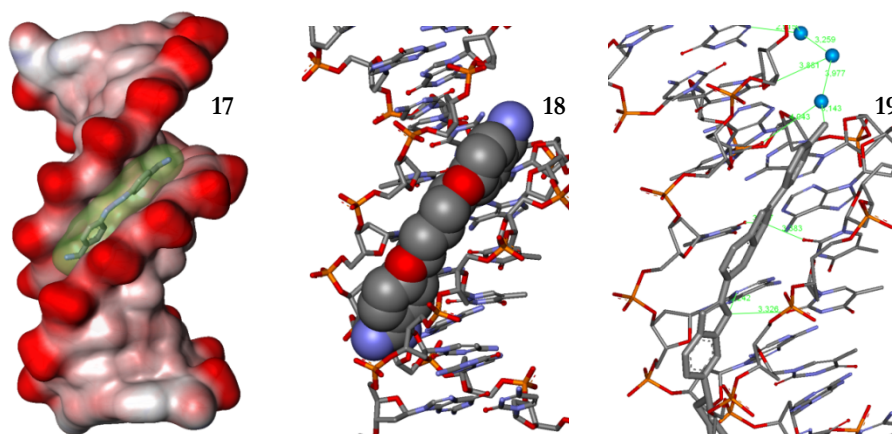


Abbildung 2-25: Strukturen von Berenil (17), Pentamidin (18) und Hoechst 3325 (19) in der kleinen Furche (PDB 1D63, 1D64, 296D). Die Bindung in die DNA-Furche erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Rückgrat der DNA, π - und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu den Seitenwänden und Wasserstoff-Brückenbindungen zu den Basenpaaren am Boden der Furche.

Berenil (17) wird in der Tiermedizin zur Behandlung trypanosomaler Infektionen (z. B. der Schlafkrankheit) eingesetzt. Pentamidin (18) kommt sowohl bei der Behandlung der Schlafkrankheit als auch bei der Behandlung von *Pneumocystis carinii* pneumonia, der am häufigsten vorkommenden lebensbedrohlichen Infektion bei AIDS-Patienten, zum Einsatz. Hoechst-33258 (19) und seine Derivate inhibieren die Transkription spezieller Gene und werden wie DAPI als Marker in der Fluoreszenz-Mikroskopie genutzt. Die bisher diskutierten synthetischen Rezeptoren binden zwar alle effektiv die DNA und sind dadurch wirksame Medikamente oder Marker, ermöglichen aber nicht die selektive Bindung ausgewählter Sequenzen.

Unter den in Abbildung 2-23 gezeigten natürlichen vorkommenden DNA-Rezeptoren sind die anti-bakteriellen und anti-viralen Antibiotika Netropsin (14) und Distamycin (15) bezüglich ihrer Struktur die einfachsten Moleküle und daher synthetisch leicht zu variieren. Die detaillierten Untersuchungen der beiden Polyamide und ihrer Analoga⁷² ermöglichten das Verständnis für die physikalischen Grundlagen der Wechselwirkung von Molekülen mit der kleinen Furche bis hin zur Etablierung eines molekularen Codes,⁵⁷ der es mit Hilfe modifizierter Distamycin-Strukturen ermöglicht, DNA-Sequenzen in der kleinen Furche selektiv zu erkennen. Netropsin (14) und Distamycin (15) sind sichelförmige Polyamide bestehend aus mehreren über Amidgruppen verbrückte Pyrrol-Einheiten und besitzen bei physiologischem pH positiv geladenen Endgruppen. Netropsin (14) besitzt eine geladene Guanidin- und eine geladene Amidin-Endgruppe, während Distamycin (15) eine geladene Amidin-Gruppe und eine ungeladene Formylgruppe als Endgruppen aufweist. Beide Polyamide binden bevorzugt an AT-

reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA. Die erste Röntgenstrukturanalyse eines DNA/Netropsin 1:1-Komplexes zeigt deutlich die form-selektive Erkennung der kleinen Furche (s. Abbildung 2-26 links). Das sichelförmige Netropsin fügt sich passgenau in die AT-reiche Furche des *Dickerson-Drew* Dodecamers²⁸ (d(CGCGAATTCGCG)₂). Alle drei Amid-NH-Gruppen sind zum Boden der Furche hin ausgerichtet und können so mit den Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren der AT- bzw. TA-Basenpaare wechselwirken (N(3) von A und O(2) von T). Die kationischen Endgruppen wechselwirken nicht mit den Phosphaten des Rückgrats, sondern orientieren sich zum Boden der Furche und bilden weitere Wasserstoff-Brückenbindungen mit N(3) des Adenins aus. Insgesamt bindet Netropsin an ein Set von vier Basenpaaren (AATTC) (s. Abbildung 2-26 rechts). Die kleine Furche AT-reicher Regionen ist relativ eng (0,32 nm²⁹) und aufgrund der fehlenden Guanin-NH₂-Gruppe etwas tiefer als die durchschnittliche kleine Furche der „kanonischen“ B-DNA (0,60 nm). Dies fördert die zusätzliche Ausbildung von Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Pyrrolringen und den Seitenwänden der Furche und eine bessere Einpassung des Moleküls in die Furche. Die Bindungsstärke von Netropsin **14** an die Basensequenz 5'-AATTC-3' liegt bei etwa 10⁷-10⁸ M⁻¹.⁷³

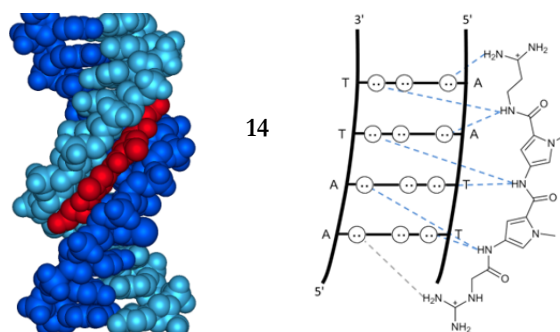


Abbildung 2-26: Links: Kristallstruktur des 1:1-Komplexes von Netropsin (**14**) und DNA (PDB 6BNA). **Rechts:** Schematische Darstellung der Wasserstoff-Bindungen zwischen Netropsin (**14**) und den Basenpaaren am Boden der Furche.⁶⁴

Distamycin (**15**) unterscheidet sich im Wesentlichen von Netropsin durch das Vorhandensein nur einer kationischen Guanidiniumgruppe und einer weiteren Pyrroleinheit. Die Bindung in die kleine Furche erfolgt ebenfalls in AT-reichen Regionen und die Wechselwirkungen finden mit den Basenpaaren am Boden der Furche über ein ähnliches Netzwerk von Wasserstoff-Brückenbindungen wie bei Netropsin an N(3) von Adenin und O(2) von Thymin statt. Allein die Bindung von Distamycin an die kleine Furche erstreckt sich über fünf statt vier Basenpaare wie bei Netropsin. Kalorimetrische Studien ergaben eine Bindungskonstante von etwa 3·10⁸ M⁻¹ für Distamycin mit dem Oligonukleotid d(GCGAATTCGCG)₂.^{74,75} Obwohl kristallographische⁷⁶ und NMR-Daten⁷⁷ die Existenz von analogen 1:1-Komplexen von Distamycin belegen, konnten *Wemmer* und Mitarbeiter erstmals mittels 2D-NMR-Spektroskopie zeigen,

dass Distamycin neben dem beschriebenen 1:1-Komplex auch einen antiparallelen head-to-tail 2:1-Komplex mit AT-reichen Sequenzen bildet (s. Abbildung 2-27).^{74,78}

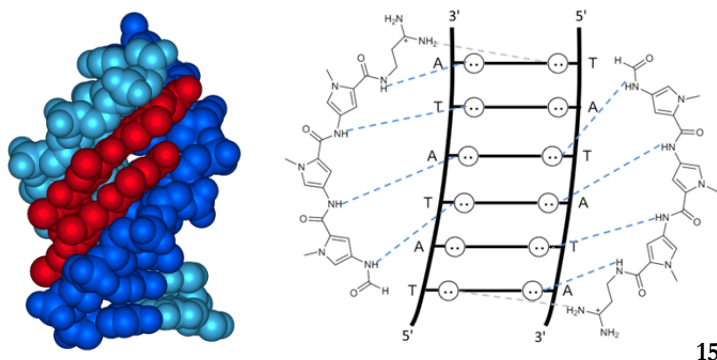


Abbildung 2-27: Struktur des 2:1-Komplexes von Distamycin (**15**) mit dem Oligonukleotid d(GTATATAC)₂. Die Wasserstoff-Bindungen zwischen Distamycin (**15**) und den Basenpaaren sind schematisch dargestellt. (PDB 378D)⁷⁹

Beide Distamycin-Moleküle sind Seite an Seite antiparallel in der kleinen Furche gebunden. Die antiparallele Orientierung der Distamycin-Moleküle in der kleinen Furche verhindert, dass sich die beiden positiv geladenen Endgruppen gegenüber stehen. Netropsin bildet vermutlich keinen 2:1-Komplex aufgrund seiner zwei jeweils positiv geladenen Endgruppen. Jedes der beiden Distamycin-Moleküle bildet ein Wasserstoff-Brücken-Netzwerk mit jeweils einem der beiden DNA-Stränge aus. Die antiparallele Anordnung zweier Moleküle führt zwangsläufig im Bereich der Bindung zu einer Verbreiterung der kleinen Furche um etwa 0.2 nm im Vergleich zur „kanonischen“ B-DNA.

Netropsin-Derivate (**20** und **21**, sogenannte Lexitropsine, s. Abbildung 2-28 links), bei denen ein oder beide Pyrrolringe (Py) durch *N*-Methylimidazolringe (Im) ausgetauscht wurden, zeigen eine Tendenz GC-Basenpaare zu binden aber auch häufig eine verringerte generelle DNA-Affinität. Die Bindungsstärke der Lexitropsine liegt etwa im Bereich von $1\text{--}2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Durch den Austausch des Pyrrolrings durch einen *N*-Methylimidazolring wird eine Donor-Gruppe durch eine Akzeptor-Gruppe ersetzt, die in der Lage ist, mit der NH₂-Gruppe des Guanins zu wechselwirken (s. Abbildung 2-28 rechts).^{80,81}

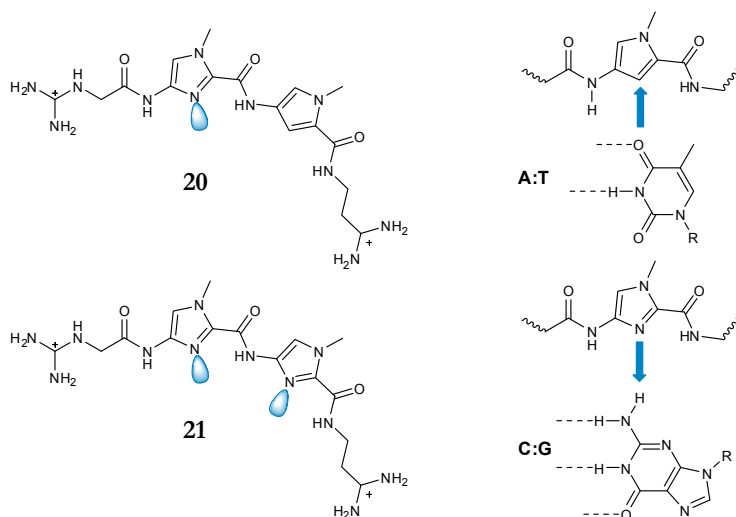


Abbildung 2-28: Links: Strukturen der Netropsin-Derivate **20** und **21**, bei denen jeweils ein bzw. zwei Pyrrolringe durch *N*-Methylimidazolringe ausgetauscht wurden. **Rechts:** Schematische Präsentation der Präferenz für AT-Sequenzen der *N*-Methylpyrrol-Einheit und die Präferenz für GC-Sequenzen der *N*-Methylimidazolgruppe.

Die Kombination des 2:1-Motivs (wenn nur eine Endgruppe des Moleküls geladen ist) mit dem Konzept der Lexitropsine (anstelle eines Pyrrolrings wird ein Imidazolring zur Erkennung von GC bzw. CG eingebaut) ermöglicht die Synthese neuer Moleküle mit einer höheren Spezifität und effektiveren Bindung. Diese neue Klasse von Polyamiden kann sowohl präzise Wasserstoff-Brücken ausbilden, um die jeweiligen Basenpaare zu erkennen, als auch die breitere kleine Furche von GC-reichen Sequenzen ausfüllen, in die zwei zusammengelagerte Moleküle binden können. Die Effektivität der Bindung wird nicht nur durch die genauere Einpassung in die breitere Furche GC-reicher Sequenzen erreicht, sondern auch durch die Erkennung beider DNA-Stränge im 2:1-Komplex. *Dervan* und Mitarbeiter synthetisierten das von Distamycin abgeleitete Polyamid ImPyPy **22**, welches als antiparalleles Dimer in der kleinen Furche selektiv die Sequenz 5'-(W)G(W)C(W)-3' (W = A oder T) bindet (s. Abbildung 2-29 links).

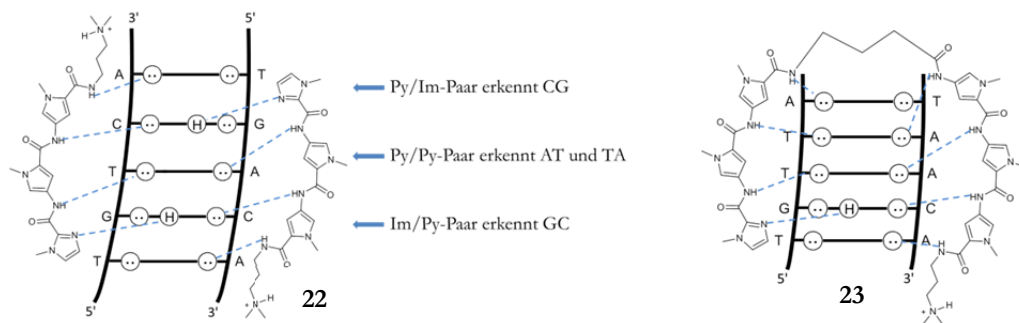


Abbildung 2-29: Links: Schematische Darstellung der Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Distamycin-Derivat ImPyPy **22** und der Oligonukleotid-Sequenz 5'-TGTCA-3'. Das unsymmetrische Py/Im-Paar differenziert zwischen CG- und GC-Basenpaare, während das Py/Py-Paar sowohl AT- als auch TA-Basenpaare erkennt. **Rechts:** Schematische Darstellung des Komplexes, der sich zwischen dem Hexapeptid ImPyPy-GABS-P3 **23** und der Sequenz 5'-TGTTA-3' bildet.

Das im Dimer gestapelte Py/Im-Paar erkennt selektiv GC-Basenpaare während das Im/Py-Paar selektiv CG-Basenpaar erkennt. Im Gegensatz dazu bindet das Py/Py-Paar AT- oder TA-Basenpaare unterscheidet aber nicht zwischen beiden.^{82,83} Abhängig von der zu erkennenden DNA-Sequenz ist ein Homodimer nicht immer ausreichend zur selektiven Bindung der jeweiligen Basenpaare sondern es ist ein Heterodimer erforderlich. Für den Fall, dass zwei unterschiedliche Polyamide je an einen DNA-Strang binden, wird eine kovalente Verknüpfung benötigt, die die beiden Moleküle Seite an Seite bindet, so dass die Bindung an die DNA als Heterodimer und nicht in Form der beiden möglichen Homodimere bevorzugt wird. *Dervan* und Mitarbeiter entwickelten verschiedene Verknüpfungsmotive und konnten zeigen, dass durch die kovalente Verknüpfung zweier geeigneter Ligandenpaare mit komplementären Bindungseigenschaften Affinität und Spezifität gesteigert werden konnten. Mit γ -Aminobutylsäure (GABS oder γ) verknüpften *Dervan* und Mitarbeiter ein ImPyPy-Monomer mit einem Distamycin-Derivat (P3) zu dem in Abbildung 2-29 rechts gezeigten Hairpin-Motiv **23** (ImPyPy-GABS-P3).⁸⁴ Verbindung **23** erkennt mit hoher Affinität (10^8 M^{-1}) und hoher Selektivität die Sequenz 5'-TGTTA-3' (s. Abbildung 2-29 rechts). Hairpin-Motive **24** (ImPyPyPy- γ -ImPyPyPy- β -Dp) (Dp = N,N-Dimethylaminopropylamid) und **25** (ImPyPyPy- γ -PyPyPyPy- β -Dp) binden entsprechende Sequenzen mit Affinitäten und Spezifitäten vergleichbar mit Protein-Transkriptions-Faktoren (s. Abbildung 2-30).⁸⁵

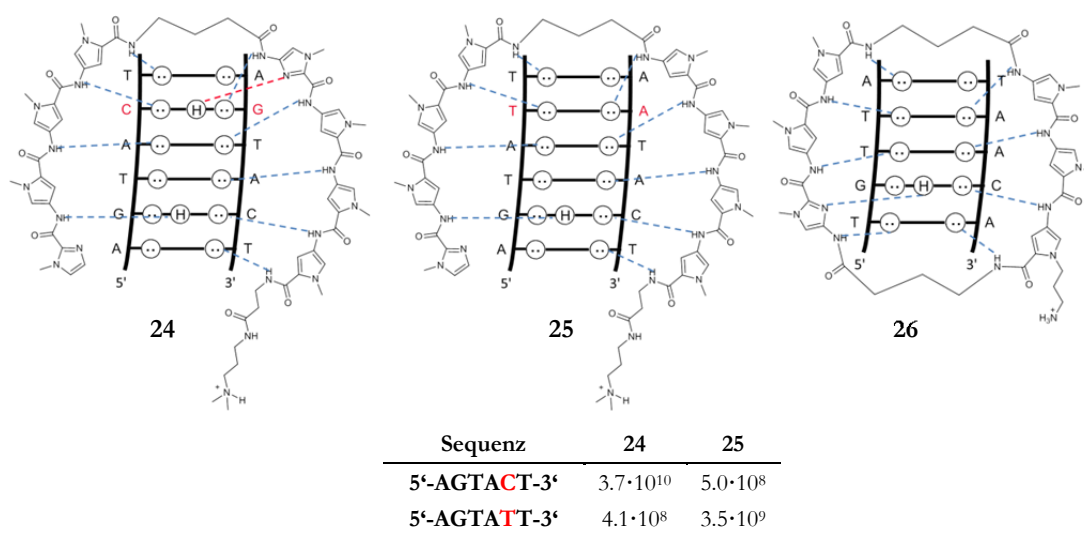


Abbildung 2-30: Schematische Darstellung der Komplexe von Hairpin-Motiv **24** und der Oligonukleotid-Sequenz 5'-AGTACT-3' und Hairpin-Motiv **25** und der Oligonukleotid-Sequenz 5'-AGTATT-3'. Tabellarisch aufgelistet sind die mittels eines DNase Footprint-Titrationsexperiments bestimmten Bindungskonstanten [M^{-1}] der Hairpin-Motive mit den entsprechenden Sequenzen. Messbedingungen: 10 mM TrisHCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , pH 7.0, 22 °C.⁸⁵ Schematische Darstellung des Komplexes der cyclischen Verbindung **26** (Cyclo-(Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- γ)) mit der Oligonukleotidsequenz 5' TGTTA-3'.⁸⁶

Die Flexibilität der Hairpin-Motive lässt sich durch eine Erweiterung des Hairpin-Motivs auf ein cyclisches Dimer, dessen beide Enden verknüpft sind, noch weiter einschränken. Die

cyclische Verbindung **26** (Cyclo-(Im-Py-Py- γ -Py-Py-Py- γ)) bindet die Sequenz 5'-TGT^{*}TA-3' mit einer Bindungskonstante von $2.9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ im Vergleich zur Bindungskonstante von $7.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ des Hairpin-Analoges **23**, welches wiederum 400mal stärker bindet als das nicht verknüpfte Dimer.⁸⁶ Trotz der Verbesserung der Bindungsstärke und Selektivität war es bis zu diesem Zeitpunkt nur möglich Liganden zu entwickeln, die zwischen den Basenpaaren CG, GC und AT/TA aber nicht zwischen AT und TA-Paaren unterscheiden können. Der entscheidende Folgeschritt zur Vervollständigung des „Vier-Basen-Codes“ war zusätzlich zu dem Pyrrolbaustein **27** und dem Imidazolbaustein **28** die Einführung des rational entwickelten Bausteins Hydroxypyrrol **29** (Hp). Die Hydroxylgruppe formt Wasserstoff-Brückenbindungen zum O(2) des Thymins und fügt sich perfekt in die Lücke zwischen T und A ein, während aus sterischen Gründen keine Wechselwirkungen mit Adenin möglich sind (s. Abbildung 2-31).

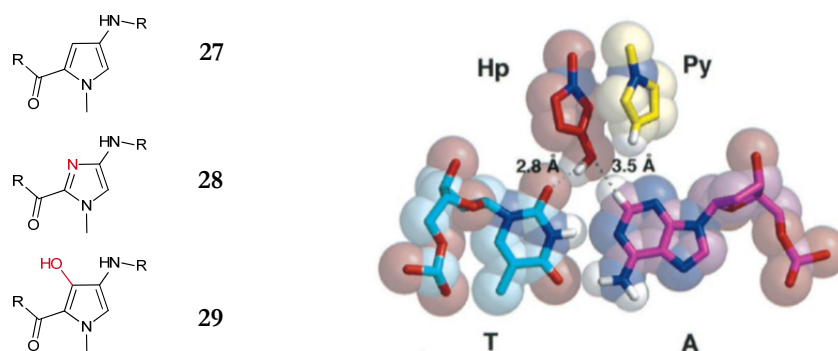


Abbildung 2-31: Links: Strukturen der drei Bausteine für die selektive dsDNA-Erkennung Py (**27**), Im (**28**) und Hp (**29**). **Rechts:** Raumfüllendes Modell der Wechselwirkungen des Hp/Py-Paares mit einem TA-Basenpaar lassen erkennen, dass Hp-OH sich in die Lücke, die das C(2)H des Adenosins bildet, exakt einpasst. From C. L. Kielkopf, S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. C. Rees, *Science*, **1998**, 282, 111-115. Reprinted with permission from AAAS.

Mit Einführung des Hydroxypyrrols ist der „Vier-Basen-Code“ zur selektiven Erkennung der kleinen Furche vollständig. Tabelle 2-2 zeigt den Code bestehend aus Paaren von aromatischen Ringen, die jeweils eines der vier Basenpaare binden. Für jede Sequenz kann so theoretisch ein maßgeschneiderter Rezeptor entworfen werden.⁸⁷

Paar	G C	C G	T A	A T
Im/Py	+	-	-	-
Py/Im	-	+	-	-
Hp/Py	-	-	+	-
Py/Hp	-	-	-	+

Tabelle 2-2: „Vier-Basen-Code“ zur selektiven Erkennung der kleinen Furche (günstige Wechselwirkung (+), ungünstige Wechselwirkung (-)).

Die auf dem „Vier-Basen-Code“ basierenden Strukturen wurden unter anderem mit einer Vielzahl DNA-bindender Substanzen und Zytostatika kombiniert. Durch Kombination der sequenzselektiven Polyamide mit einem Peptidstrang, der zur Aktivierung der Polymerase

dient, gelang es *Dervan* und Mitarbeitern *in vitro* bestimmte Genabschnitte zu aktivieren.⁸⁸ Auch Hairpin oder cyclische Pyrrol-Imidazol Polyamide, die nicht mit DNA-bindender Substanzen oder Zytostatika kombiniert wurden, vermögen aufgrund ihrer DNA-Affinität regulatorische Zellmechanismen zu beeinflussen. Entsprechende Pyrrol-Imidazol Polyamide zeigen in Zellkulturen Antitumoraktivität wie z. B. im Fall von Prostatakrebszellen.⁸⁹ Die beschriebenen Polyamide verfügen somit über großes Potential zur Genregulierung mit der Möglichkeit zur klinischen Anwendung.

Die Erkennung der DNA über Bindung künstlicher Liganden an die kleine Furche hat sich als hervorragende Methode zur DNA-Bindung herausgestellt. Die Erkennung der kleinen Furche verläuft mit sehr hohen Bindungsaffinitäten, die zum Teil mit der Größenordnung von Protein-DNA Affinitäten vergleichbar sind. Grundlegend für eine effektive Bindung sind die Komplementarität der Krümmung der Furche und des Liganden. Ebenso wird durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen des Liganden mit dem Boden und den Seitenwänden der Furche eine hervorragende Spezifität und Selektivität erreicht. Die Erfüllung dieser Voraussetzung macht es möglich in Zellmechanismen wie die Genregulierung einzugreifen. Jedoch sind aufgrund der Abhängigkeit der Helix-Mikrostruktur von der Abfolge der Basenpaare und Packungseffekten im Zellkern nicht alle DNA-Sequenzen auf diesem Wege zugänglich. Neben der Erkennung der kleinen Furche bietet auch die Interkalation zwischen die Basenpaare bzw. die Kombination aus beiden Möglichkeiten einen weiteren Weg zur Erkennung der DNA.

2.2.5 Interkalation zwischen den Basenpaaren

Da die Interkalation von Rezeptoren zwischen die Basenpaare als weitere Möglichkeit der DNA-Bindung für die vorliegende Arbeit von geringer Bedeutung ist, soll diese Art der DNA-Erkennung im Folgenden nur der Vollständigkeit halber kurz diskutiert werden. Das Konzept der Interkalation wurde 1960 von *Lerman* eingeführt.⁹⁰ DNA-Interkalatoren sind in der Regel planare, elektronenarme, aromatische, oft auch heteroaromatische Ringsysteme, die eine positive Ladung bei neutralem pH besitzen. Die Interkalation erfolgt zwischen die Basenpaare der DNA (s. Abbildung 2-32) und erfordert ein sich Entwinden des DNA-Doppelstrangs und die Trennung der Basenpaare, so dass eine Kavität entsteht. Der Basenabstand weitet sich dabei von 3.4 Å auf 6.8 Å auf.

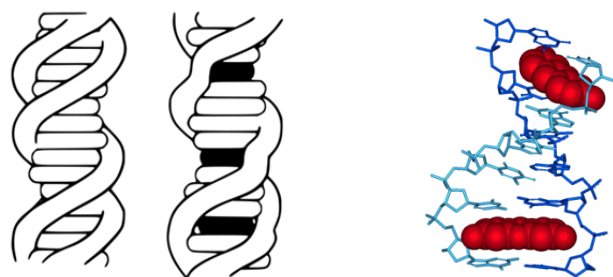


Abbildung 2-32: Links: Schematische Darstellung der Interkalation von Molekülen zwischen die Basenpaare. **Rechts:** Struktur des DNA-Oligonukleotid 5'-CGATCG-3' mit zwei Molekülen Proflavin (**32**), die zwischen die Basenpaare interkalieren (PDB 3FT6).

Da das Phosphat-Rückgrat nur bis zu einem gewissen Grad flexibel ist, kann nicht zwischen jedes Basenpaar ein Molekül eingefügt werden. Die maximale Beladung beträgt ein Molekül alle zwei Lücken (neighbour-group exclusion principle).¹⁵

Abbildung 2-33 zeigt eine Auswahl unterschiedlicher DNA-Interkalatoren.

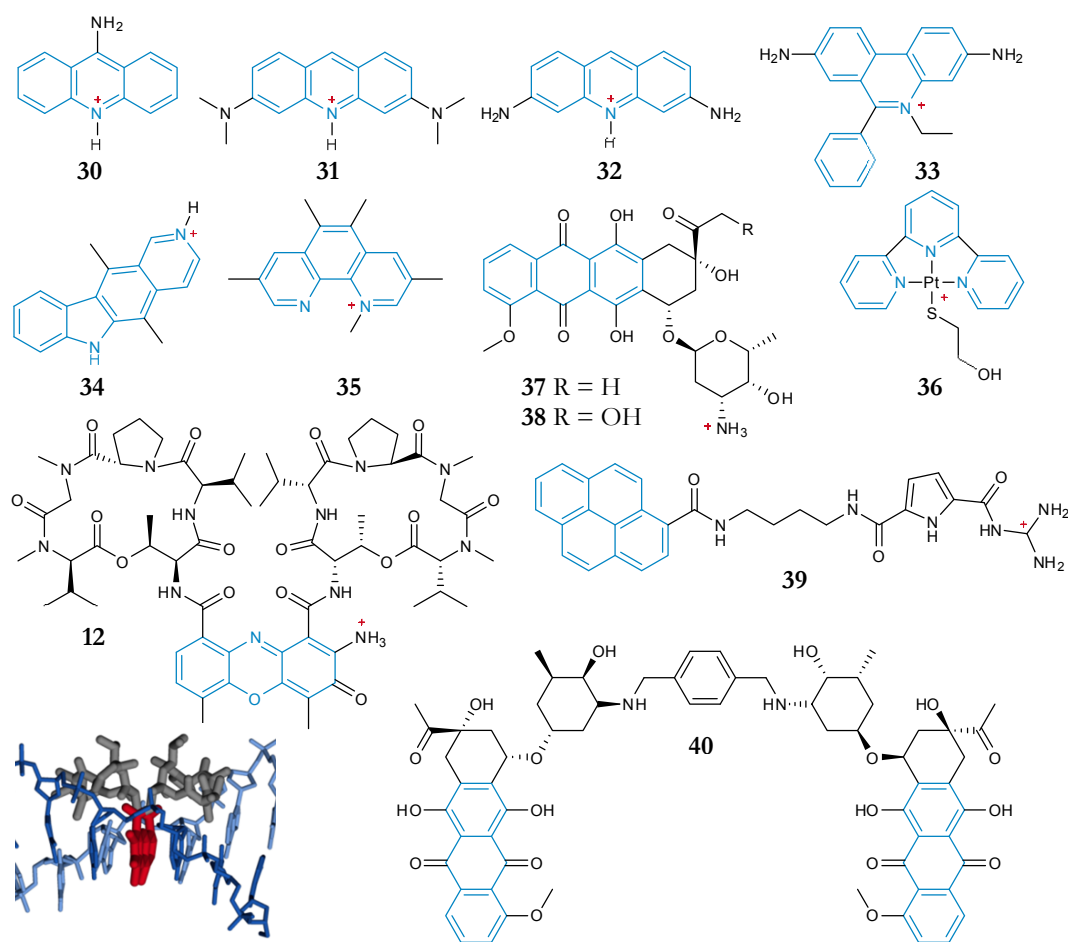


Abbildung 2-33: Strukturen einiger ausgewählter DNA-Interkalatoren: 9-Aminoacridin (**30**), Acridin Orange (**31**), Proflavin (**32**), Ethidium (**33**), Ellipticin (**34**), 3,5,6,8-Tetramethyl-N-methylphenanthrolium (**35**), 2-Hydroxy-ethanethiolato-2,2',2''-terpyridin-platin(2) (**36**), Daunomycin (**37**), Doxorubicin (**38**), Actinomycin D (**12**) mit Röntgenstrukturanalyse der Bindung von Actinomycin D an die DNA, bifunktionaler Interkalator (**39**), Beispiel für einen Bisinterkalator (**40**).

Einfache Interkalatoren, wie z. B. 9-Aminoacridin (**30**), Acridin Orange (**31**), Proflavin (**32**), Ethidium (**33**) und Ellipticin (**34**) besitzen nur das für die eigentliche Interkalation wichtige Ringsystem. Sogenannte Bisinterkalatoren sind bifunktionelle Moleküle, die aus zwei kovalent verbrückten interkalierenden aromatischen Ringsystemen bestehen (z. B. Interkalator **40**). Ein solcher Bisinterkalator besitzt im Vergleich mit dem entsprechenden Monointerkalator in der Regel eine höhere Affinität. Die Struktur einer Vielzahl von weiteren Interkalatoren beschränkt sich nicht nur auf das aromatische Ringsystem, sondern verfügt noch über zusätzliche Substituenten wie z. B. Zuckerstrukturen oder peptidischen Gruppen (Interkalatoren **12**, **37**, **38**). Diese zusätzlichen funktionellen Gruppen binden wie im vorherigen Kapitel beschrieben in die Furchen der DNA. Während die Interkalation zwischen die Basenpaare selber z. B. nur zu einer minimalen Bevorzugung vom 5'-Pyrimidin-Purin-3' Dinukleotiden führt, kann durch unterschiedliche funktionelle Gruppen, die in die Furchen binden, eine verbesserte Sequenzselektivität und thermodynamische Stabilität erzielt werden.

2.2.5.1 Protein Interkalation

Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin sind die natürlich vorkommenden Aminosäuren, die einen aromatischen Rest in der Seitenkette aufweisen. Bis auf Tryptophan weisen alle Aminosäuren nur ein einfaches Ringsystem auf. Dies bedeutet, dass die zur Verfügung stehenden π -Flächen der Aminosäuren wesentlich kleiner sind als diejenigen, die in den synthetischen Interkalatoren zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund wird bei Proteinen keine analoge Interkalation beobachtet, wie sie bei den zuvor beschriebenen Interkalatoren stattfindet. Dennoch nutzen DNA-bindende Proteine eine andere Art von Interkalation, bei der die wesentlich kleineren aromatischen Reste sich zwischen die Ränder der Basenpaare schieben. Diese teilweise Interkalation führt zu einer Abwinkelung der zuvor planar gestapelten Basenpaare und damit zu einer Beugung der DNA.^{3,15} Abbildung 2-34 zeigt das sogenannte TATA-Box-Bindeprotein. Dieses Protein enthält zwei Phenylalaninreste, die sich an jeweils einem Ende der DNA-Erkennungsregion befinden und durch teilweise Interkalation zwischen die Basenpaare zum Beugen der DNA führen.⁹¹

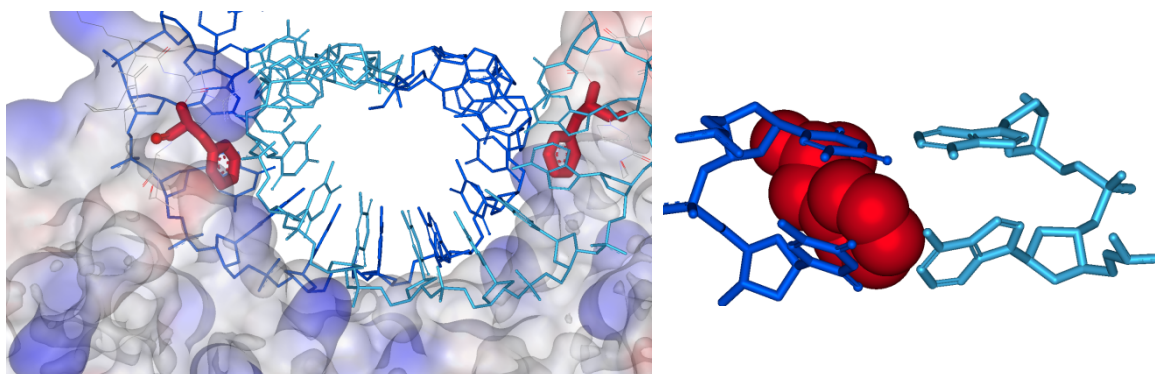


Abbildung 2-34: Links: Illustration der Wechselwirkung des TATA-Box-Bindeproteins und dsDNA. Zwei Phenylringe (rot) interkalieren an beiden Enden der gebeugten DNA zwischen die Basenpaare. **Rechts:** Nahansicht der teilweisen Interkalation des Phenylrings (rot) (PDB 1QNA).⁹¹

Während bei synthetischen Interkalatoren die π - π -Wechselwirkungen die Bindung dominieren, scheinen bei der teilweisen Interkalation der Proteine CH/ π -Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Wechselwirkungen sind scheinbar auch nicht nur auf die aromatischen Aminosäuren beschränkt, auch Aminosäuren wie Methionin scheinen auf diese Weise zu interkalieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Interkalation zwischen die Basenpaare eine sehr effektive Methode ist, um große Bindungskonstanten zu erzielen. Besonders die Verknüpfung zweier Interkalatoren mit einem entsprechenden Linker führt zu hohen Affinitäten zwischen Molekül und DNA. Durch die Einlagerung der Interkalatoren zwischen die Basenpaare wird die Replikation und Transkription der DNA behindert. Dies wird als Ursache sowohl für die chemotherapeutische und antibiotische Wirkung der Interkalatoren wie z. B. Actinomycin (**12**) oder Daunomycin (**37**) als auch für die toxischen und mutagenen Eigenschaften vieler Interkalatoren angenommen. Dennoch kommen Interkalatoren z. B. bei der Behandlung von Krebs oder als Antibiotika zum Einsatz. Naturstoffe wie Bleomycin besitzen neben der Interkalationseinheit zusätzliche Elemente, deren Funktion darin besteht, die DNA neben der Interkalation auch zu schädigen und den Zelltod zu verursachen.⁹² Als Alternative zur Interkalation hat sich die Erkennung der kleinen Furche bewährt. Verbindungen, die die kleine Furche erkennen, binden die DNA mit vergleichbaren oder sogar höheren Affinitäten als einige Interkalatoren bis hin zu Bindungskonstanten, die in der Größenordnung von DNA-bindenden Proteinen liegen. Entscheidend ist, dass sie im Gegensatz zu Interkalatoren eine sehr gute Spezifität und Selektivität aufweisen. Dies wird durch die komplementären Formen der Furche und des bindenden Moleküls und eine Vielzahl von Wechselwirkungen erreicht, die zu den Basen am Boden der Furche und den Desoxyribosen an den Wänden der Furche ausgebildet werden. Durch die spezifische und selektive Erkennung der kleinen Furche ergibt sich die Möglichkeit der kontrollierten Genexpression.

2.3 Erkennung von Kohlenhydraten in Wasser

2.3.1 Struktur und Funktion von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate zählen zu den vier wichtigsten Klassen natürlicher Makromoleküle: Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate. Kohlenhydrate sind ubiquitär vorkommende Biomoleküle, die weltweit durch Photosynthese in etwa 200 Milliarden Tonnen pro Jahr entstehen.⁹³ Bis in die späten sechziger Jahre hat man für sie nur zwei Funktionen gesehen: als Energiespeicher und als biologisches Baumaterial. Die Stärke in Pflanzen und Glykogen in Tieren besteht aus Polysacchariden, die zu Glucose abgebaut werden, um Energie zu gewinnen. Auch ATP als universelle „Energiewährung“ ist ein phosphoryliertes Zuckerderivat. Das Gerüst der DNA und der RNA besteht aus Desoxyribose und Ribose. Als Baumaterial spielen die Polysaccharide in Form von Zellulose in Pflanzen und in Form von Chitin im Außenskelett von Insekten eine Rolle.³ Erst zu Beginn der sechziger Jahre - mit der Erkenntnis, dass alle Zellen einen Mantel aus Kohlenhydraten haben - hat die Bedeutung der Oligosaccharide für die biologische Regulation Aufmerksamkeit erregt. Kohlenhydrate verfügen über ein weit größeres Potential zur Informationsspeicherung als Proteine und Nukleinsäuren. Sie können hoch verzweigte Moleküle aufbauen. Zwei Monosaccharide lassen sich aufgrund ihrer Oligofunktionalität auf viele verschiedene Arten miteinander verknüpfen. Eine Hexapyranose kann z. B. an fünf verschiedenen Hydroxygruppen mit anderen Zuckermolekülen glycosidisch verknüpft werden (s. Abbildung 2-35).⁹³

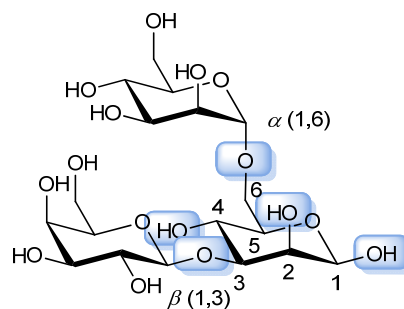


Abbildung 2-35: In einer Hexapyranose können fünf verschiedene Hydroxygruppen (blau) jeweils α - und β -glycosidisch mit weiteren Zuckerbausteinen verknüpft sein. Hier gezeigt am Beispiel eines Trisaccharids.

Die Monomereinheiten der Nukleinsäuren und Proteine hingegen lassen sich fast immer linear und nur mit einer Art Bindung (3'-5' Phosphodiesterbindung oder Amidbindung) verknüpfen. So lassen sich aus vier Nukleotiden 24 verschiedene Tetranukleotide aufbauen, während ein Tetrasaccharid aus vier verschiedenen Monosacchariden 34560 isomere Strukturen

ausbilden kann. Aus diesem Grund findet man in der Natur Oligosaccharide als Informationsspeicher, wobei die biologische Information strukturell verschlüsselt ist. Diese Information wird durch Kohlenhydrat-Protein-Komplexe gelesen und umgesetzt. Solche Proteine werden als Lektine und Selektine bezeichnet. Diese Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bilden die Grundlage vieler biologischer Prozesse wie der Zelladhäsion, der Infektion von Zellen durch Pathogene, der Verteilung und Reaktivität von Proteinen in den Zellen, vieler Formen der Immunreaktion und sie spielen auch eine entscheidende Rolle bei Befruchtung, Entzündung und Metastasierung.⁹⁴

Auf das wiederaufkeimende Interesse an Kohlenhydraten wurde auch in der präparativen Chemie reagiert. In der supramolekularen Chemie wurde und wird versucht, effektive künstliche Kohlenhydratrezeptoren zu entwickeln und zu synthetisieren. So könnten synthetische Kohlenhydratrezeptoren als Arzneimittel, zum Angreifen bestimmter Zellarten (als „synthetische Antikörper“), zum Transport von Kohlenhydraten oder verwandten Substanzen durch Zellmembranen oder als Kohlenhydratsensoren verwendet werden.⁹⁵ Um künstliche Rezeptoren synthetisieren zu können, benötigt man ein detailliertes Wissen über den Aufbau von natürlichen Kohlenhydratrezeptoren und den Ablauf der Erkennung in der Natur.

2.3.2 Kohlenhydraterkennung in der Natur

Die Entwicklung künstlicher Rezeptoren, die einen bestimmten Gast biologischen Ursprungs erkennen und komplexieren, ist ein wichtiges und aktives Forschungsgebiet in der supramolekularen Chemie. Obwohl in diesem Teilgebiet der Chemie große Fortschritte bezüglich der Komplexierung von Aminosäuren und kleinen Peptiden gemacht wurden, stellt die molekulare Erkennung von Zuckern weiter eine Herausforderung dar. Seit Ende der achtziger Jahre ist das Interesse an der Komplexierung von Kohlenhydraten kontinuierlich gestiegen. Obwohl gleichzeitig eine zunehmende Anzahl Strukturen von Protein-Kohlenhydrat-Komplexen röntgenkristallographisch aufgeklärt wurde, trugen sie nur wenig zum Verständnis der Beiträge einzelner Wechselwirkungen zur Bindungsstärke bei.

Drickamer entdeckte 1988, dass, basierend auf Analysen von bekannten Aminosäuresequenzen von Tierlektinen, die kohlenhydratbindende Aktivität sich in den meisten Fällen auf ein begrenztes Polypeptidsegment beschränkt. Er bezeichnete diesen für die Erkennung zuständigen Bereich als Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (carbohydrate recognition domain; CRD) (s. Abbildung 2-36). Bei Arbeiten zur Struktur von Lektinen wurden spalten- oder muldenförmige Bindungsstellen (s. Abbildung 2-36) gefunden, die der Notwendigkeit entsprechen, aus Zelloberflächen herausragende Zuckerreste zu erkennen.

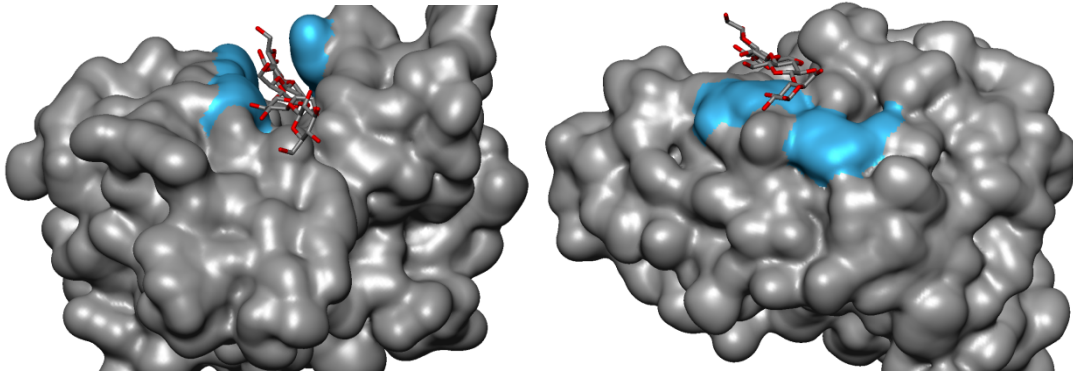


Abbildung 2-36: Beispiel für zwei verschiedenen Arten von Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (CRD). **Links:** Ein Cellopentaosemolekül sitzt in einem tiefen aktiven Zentrum von CjCBM4-2 (PDB 1GU3). **Rechts:** Ein Cellotetraosemolekül sitzt in einem muldenförmigen aktiven Zentrum von CcCBM17 (PDB 1J84). Die Oberfläche, die sich aus aromatischen Aminosäureseitenketten zusammensetzt und in die Erkennung involviert ist, ist blau dargestellt.⁹⁶

Ein Beispiel, bei dem mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturen die Erkennungsdomäne untersucht und die genaue Zusammensetzung der an der Kohlenhydratbindung beteiligten Aminosäuren erforscht wurde, ist das sogenannte Lektin FimH. FimH ist Teil eines sogenannten Typ 1 *Fimbriae*, ein Proteinkomplex, der eine Spezifität für terminale α -Mannosylreste besitzt. *Fimbriae* sind proteinogene Fortsätze an der Oberfläche von Bakterien, die die bakterielle Adhäsion an die Gastzelle vermitteln. Eine Anhäufung von Bakterien in Organen oder an Zellen kann zu schwerwiegenden Problemen für den Organismus führen. *Escherichia coli* Bakterien, die normalerweise in einer Symbiose im Darm vorkommen, können durch ein Eindringen in den Urogenitaltrakt und Vermehrung in der Blase Entzündungen wie im Fall von *Cystitis** hervorrufen. Laut mehrerer Studien sind sogenannte Typ 1 *Fimbriae* ein wichtiger und kritischer Faktor für die bakterielle Ansteckungskraft.⁹⁷ Die erste Röntgenkristallstruktur von FimH in einem Komplex mit dem Chaperon FimC wurde 1999⁹⁸ veröffentlicht, gefolgt von zwei weiteren Veröffentlichungen 2002⁹⁹ und 2005.¹⁰⁰ Alle drei verfügbaren Röntgenkristallstrukturanalysen zeigen eine einzelne Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne auf der Spitze des FimH Proteins von der Größe eines Monosacharides. Sie umfasst hauptsächlich Aminosäuren mit hydrophilen Seitenketten, einschließlich der N-terminalen Aminosäure Phe1 des Proteins (Abbildung 2-37 links). Diese Aminosäureseitenketten und besonders die zentral sitzende Asparaginsäure Asp54 unterstützen die Komplexierung des Sechsrings des α -Mannosids in der CRD, wobei die α -glycosidische Bindung zum Ausgang der Bindungstasche weist. Das Äußere der CRD besteht aus Aminosäuren mit lipophilen Seitenketten, die ein sogenanntes „hydrophobes Rückgrat“ am Eingang der Bindungstasche festlegen (Abbildung 2-37 rechts). Die aromatischen Seitenketten von Tyr48 und Tyr137 begrenzen den molekularen Eingang der CRD, welcher als

* Entzündung der unteren Harnwege

„Tyrosinpforte“ bezeichnet wird. Der unpolare Teil eines geeigneten Mannosidliganden kann somit bevorzugte CH/ π -Wechselwirkungen mit der Tyrosinpforte aufbauen.

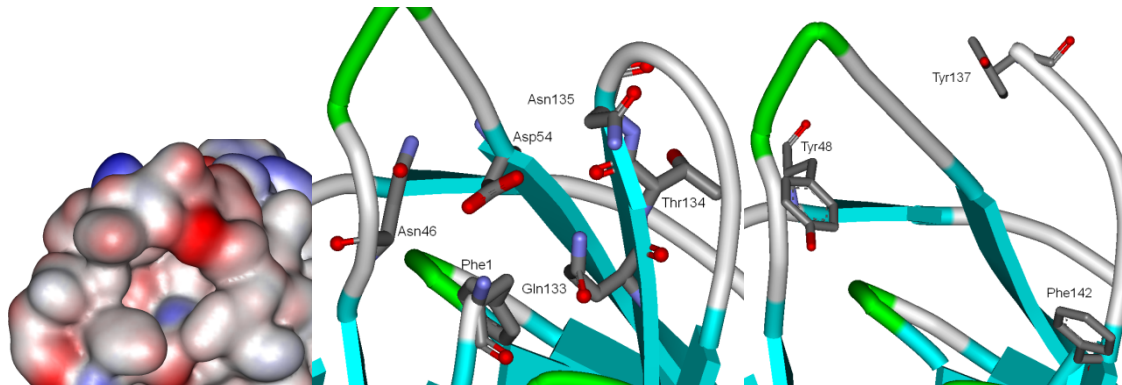


Abbildung 2-37: Detailansicht der CRD, die sich an der Spitze des FimH Proteins befindet. **Links:** CRD bildet eine tiefe Bindungstasche, in der ein Mannosylreste gebunden werden kann. **Mitte:** Das Innere der CRD von FimH umfasst hauptsächlich Aminosäuren mit hydrophilen Seitenketten, einschließlich Phe1, die N-terminale Aminosäure des Proteins. Besonders die zentrale Asparaginsäure (Asp54) bildet starke Wechselwirkungen mit gebundener Mannose aus. **Rechts:** Das Äußere der FimH CRD besteht aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten und bildet somit ein sogenanntes „hydrophobes Rückgrat“. Die Aminosäuren Tyr48 und Tyr137 flankieren den Eingang der Bindungstasche und formen ein Tor, welches als „Tyrosinpforte“ bezeichnet wird (PDB 1QUN).

In der Röntgenstrukturanalyse des in Abbildung 2-38 gezeigten *D*-Galactose/*D*-Glucose bindenden Proteins findet man parallel zur Ebene der Wasserstoffbrückenbindungscentren in sandwichartiger Anordnung die aromatischen Seitenketten von Trp183 und Phe16.

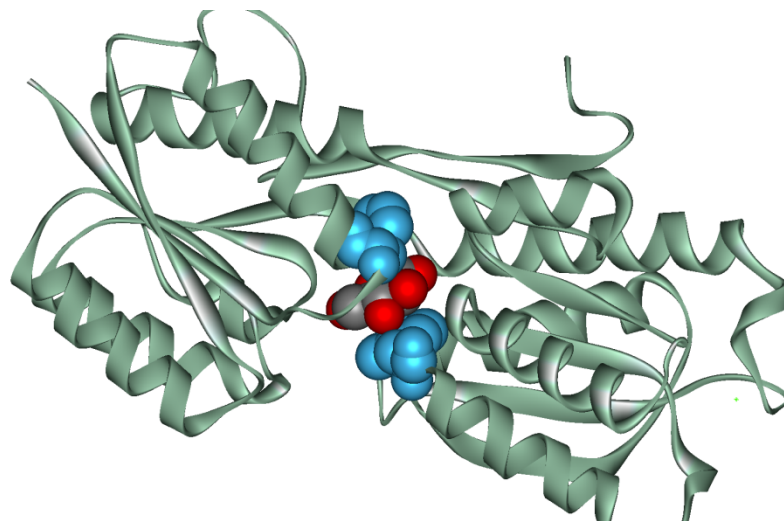


Abbildung 2-38: Schematische Darstellung des *D*-Galactose/*D*-Glucose-bindenden Proteins mit einem *D*-Glucose-Gast. Die aromatischen Seitenketten von Trp183 und Phe16 sind in CPK-Repräsentation dargestellt (PDB 2HPH).

Diese gehen CH/ π -Wechselwirkungen, welche sowohl einen Dispersions- als auch einen elektrostatischen Anteil haben, mit den axialen CH-Protonen des Pyranosids ein. Diese Anordnung trägt nicht nur durch die direkten CH/ π -Wechselwirkungen zur Erhöhung der Bindungsstärke bei, sondern vor allem auch durch den so genannten hydrophoben Effekt, d.h.

die günstige Desolvatisierung der hydrophoben Flächen im Komplexierungsschritt. Beim Aufbau der Bindungstaschen fällt auf, dass sich Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten (Tyr, Phe) häufig am Boden und am Eingang befinden, während Aminosäuren mit polaren Seitenketten (Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ser) zwischen dem Eingang und dem Boden an den Seitenwänden der Bindungstaschen lokalisiert sind. Diese polaren Reste formen zusammen mit Wassermolekülen durch Wasserstoff-Brückenbindungen - unter anderem bestehend aus kooperativen und bidentaten Wasserstoff-Bindungen - ein komplexes Netzwerk, dass durch seine Geometrie Bindungsstärke und Spezifität der Kohlenhydrat-Protein-Erkennung bestimmt (s. Abbildung 2-39).^{101,102}

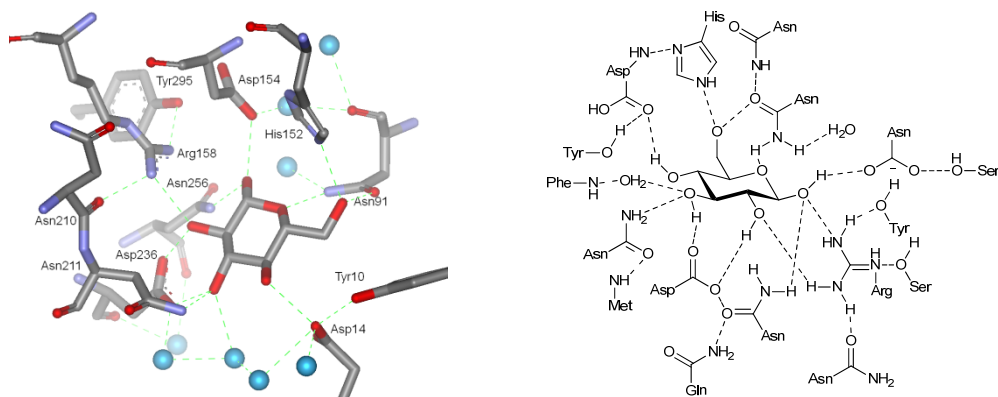


Abbildung 2-39: Schematische Darstellung der kooperativen H-Bindungen, bidentaten H-Bindungen und dem Netzwerk von H-Bindungen zwischen dem *D*-Galactose/*D*-Glucose bindenden Protein und *D*-Glucose (PDB 2HPH).

Neben hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen spielen auch ionische Wechselwirkungen bei der Erkennung von geladenen Zuckern wie Sialylsäure, Aminoazuckern und phosphorylierten oder sulfonierten Zuckern eine Rolle. Abbildung 2-40 zeigt z. B. die Wechselwirkung von Arginin mit einer Carboxylatgruppe der Sialylsäure.¹⁰³

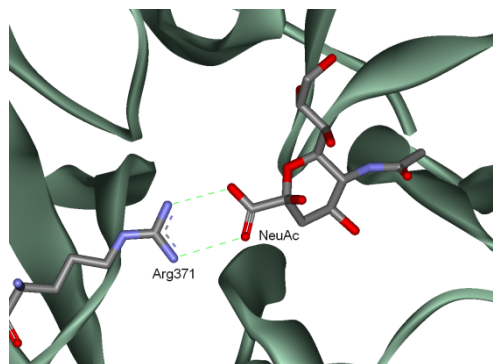


Abbildung 2-40: Wechselwirkung der Guanidiniumgruppe von Arg371 der Influenzaneuraminidase mit der Carboxylateinheit der Sialylsäure (NeuAc) (PDB 2BAT).

Die Kohlenhydraterkennung durch Proteine ergibt sich aus dem Zusammenspiel der zahlreichen, zum Teil auch schwachen, Wechselwirkungen, die in Summe die Bindung

ermöglichen. Kalorimetrische Messungen haben gezeigt, dass es bei der Bindung von Kohlenhydraten durch Proteine zu einer sogenannten Enthalpie-Entropie-Kompensation kommt.^{104,105} Die zur Bindung beitragende Enthalpie wird dabei teilweise durch eine ungünstige Entropieänderung kompensiert. Bei der Kohlenhydraterkennung spielen sowohl polare Wasserstoff-Brückenbindungen mit den OH-Gruppen des Kohlenhydrats als auch hydrophobe CH/ π -Wechselwirkungen mit den CH-Gruppen eine Rolle. Da die OH-Gruppen des umgebenden Wassers in Konkurrenz zu den OH-Gruppen des Kohlenhydrats stehen, liegt die Vermutung nahe, dass ein wesentlicher Bestandteil der freien Bindungsenthalpie durch hydrophobe Wechselwirkungen zu Stande kommt, also die solvophobe Bindung dominiert.¹⁰⁶ Diese Annahme wird durch das in Protein-Kohlenhydrat-Komplexen vorhandene Wasserstoff-Brückennetzwerk relativiert. Denn das Vorhandensein eines solchen Netzwerks weist darauf hin, dass auch spezifische Wechselwirkungen zur Bindung beitragen, also die intrinsische Bindung ebenso eine Rolle spielt.¹⁰⁷ Die Diskussion über die treibende Kraft der Bildung von Protein-Kohlenhydrat-Komplexen ist somit noch nicht endgültig abgeschlossen. Dennoch kann festgehalten werden, dass das Wesentliche der Komplexbildung die Komplementarität von Substrat und Rezeptor ist, unabhängig vom Ursprung der Gesamtbindungsenergie und das sowohl die hydrophobe als auch die intrinsische Bindung wesentlich zur Bindung beitragen.^{108,95}

Aus Röntgenkristallstrukturen lassen sich Schlüsse darüber ziehen, welche Gruppen miteinander wechselwirken, sie geben aber keine Auskunft über den energetischen Beitrag der einzelnen Wechselwirkungen. Durch die Synthese von Modellsystemen mit vergleichsweise niedriger Komplexität können die einzelnen Beiträge, die zur Bindung beitragen, durch systematische Variation von Gast oder Rezeptor viel leichter aufgeklärt und verstanden werden.

2.3.3 Synthetische Kohlenhydratrezeptoren

In den letzten Jahren hat die Rolle der Kohlenhydrate als Informationsträger in vielen biochemischen Prozessen immer mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Die Komplexbildung von Kohlenhydraten im wässrigen Medium durch künstliche Rezeptoren stellt nach wie vor eine besondere Herausforderung dar, da die OH-Gruppe als dominierende Funktionalität sich nur schwer von den Wassermolekülen, die ebenfalls mit den vorhandenen Bindungsstellen des Rezeptors wechselwirken, unterscheiden lässt. Diese Herausforderung lässt sich nur meistern, wenn es unter Einbeziehung einer breiten Vielfalt nicht-kovalenter Wechselwirkungen gelingt, eine möglichst perfekte Umgebung für den Gast zu entwerfen. Erst die gleichzeitige Wechselwirkung des Rezeptors mit den OH-Gruppen und den zusätzlichen hydrophoben Bereichen des Zuckers ermöglicht die Komplexbildung auch im wässrigen Medium. Allerdings ist nicht bekannt, was die treibende Kraft für den Austausch von Wasser gegen Kohlenhydrat-

Hydroxygruppen in natürlichen Bindungsstellen ist. Untersuchungen künstlicher Rezeptoren können somit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Abläufe von Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen in biologischen Prozessen leisten und liefern neben potentiellen Modellsystemen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe auch neue Ansatzpunkte, um biologische Prozesse zu beeinflussen.

Die selektive Erkennung von Zuckern ist insofern schwierig, da ihre dreidimensionale Struktur komplex ist und starke ionische, ebenso wie ausgedehnte hydrophobe Wechselwirkungen fehlen. Wie Lektine, die kaum oder gar keine Änderung der Konformation eingehen, wenn sie einen Zucker komplexieren, haben auch die meisten der bisher veröffentlichten Rezeptoren eher eine starre Struktur, die eine mehr oder weniger gut vororganisierte Bindungsstelle für das Substrat darstellt. Aufgrund der hohen Dichte von Hydroxygruppen in Kohlenhydraten zielt das Design der meisten Rezeptoren darauf ab, diese Funktionen zu binden. Die nicht-kovalente Bindung ist in polaren, protischen Lösemitteln schwierig. Auch die Bindung an Kohlenhydrate in der Natur ist nach biologischen Maßstäben schwach. Typische K -Werte liegen im Bereich von 10^3 bis 10^4 M^{-1} , erreichen in einigen Fällen auch Größen von 10^7 M^{-1} .¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Die einzigen künstlichen Kohlenhydratrezeptoren, die eine ähnliche Bindungsstärke im wässrigen Medium erreichen, nutzen Boronsäuren. Sie sind eine Möglichkeit, das Problem der konkurrierenden Lösemittelmoleküle durch reversible kovalente Wechselwirkungen zu umgehen. Obwohl es eine wachsende Anzahl von effektiven Rezeptoren gibt, die Boronsäuren nutzen, hat dieser Ansatz weder ein Vorbild in der Natur noch ist er supramolekular. Daher soll auf diese Art von Rezeptoren nicht weiter eingegangen werden. Für die Komplexierung von Kohlenhydraten in unpolaren Lösemitteln oder Lösemittelgemischen, die nicht um die Bindungsstellen des Rezeptors konkurrieren können, gibt es hingegen eine Vielzahl von Beispielen. Den meisten Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie ein wohldefiniertes, mehr oder weniger käfigförmiges dreidimensionales Gerüst besitzen. Die Kavitäten der künstlichen Rezeptoren können auf Porphyrinen **41**¹¹⁰, Calix[4]arenen **42**¹¹¹, Cholaphanen **43**¹¹², Polypyridinenen **44**, Polypyrimidinen **45**¹¹³, Polyamiden¹¹⁴ und Cyclodextrinen⁴⁶¹¹⁵ basieren, um nur ein kleine Auswahl zu nennen (s. Abbildung 2-41).

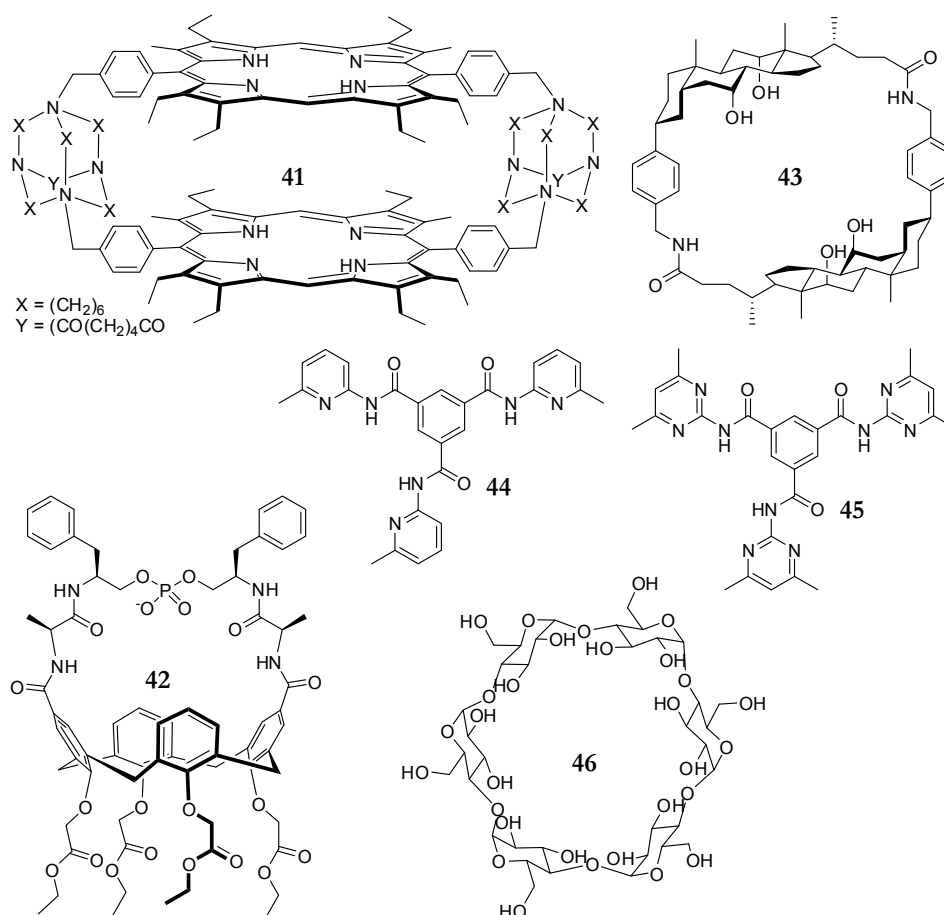


Abbildung 2-41: Ausgewählte Beispiele von künstlichen Kohlenhydratrezeptoren auf Porphyrin- **41**, Calix[4]aren- **42**, Cholaphan- **43**, Polypyridin- **44**, Polypyrimidin- **45** und Cyclodextrinbasis **46**.

Für die Komplexierung von Kohlenhydraten in wässrigen Medien sind bisher nur wenige Beispiele bekannt. Von *Mazik* und Mitarbeitern wurde ein neuerer Kohlenhydratrezeptor **47** auf Aminonaphthyridinbasis veröffentlicht, der im polaren Medium ($D_2O/[d_6]DMSO$ (1:9)) in der Lage ist, *N*-Acetylneuraminsäure (**48**) in einem 1:1 + 1:2-Rezeptor-Substrat-Komplex mit einer Bindungsstärke von $3.9 \cdot 10^3 M^{-1}$ (K_1) und $1.1 \cdot 10^4 M^{-1}$ (K_2) zu binden (s. Abbildung 2-42).¹¹⁶

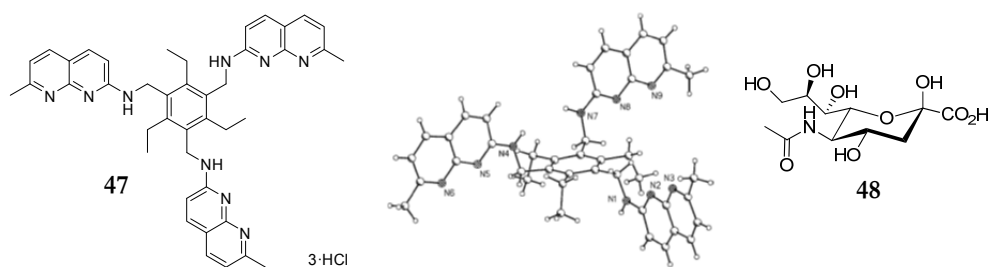


Abbildung 2-42: Struktur des Kohlenhydratrezeptors **47** auf Aminonaphthyridinbasis von *Mazik* und Mitarbeitern, Kristallstruktur von **47** und *N*-Acetylneuraminsäure (**48**).¹¹⁶ Reprinted with permission from M. Mazik, H. Cavga, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 22, 3633-3638. Copyright 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Davis und Mitarbeitern gelang 2004 die Synthese eines tricyclischen aromatischen Polyamidrezeptors, der in der Lage ist, auch in wässriger Lösung selektiv verschiedene

Glucoside zu binden.^{117,118} Aufbauend auf diesen Arbeiten veröffentlichten Davis und Mitarbeiter 2007 einen tetracyclischen Rezeptor **49**, der verschiedene Disaccharide selektiv mit verhältnismäßig guten Affinitäten binden und zwischen Disachariddiastereoisomeren unterscheiden kann (s. Abbildung 2-43 links).

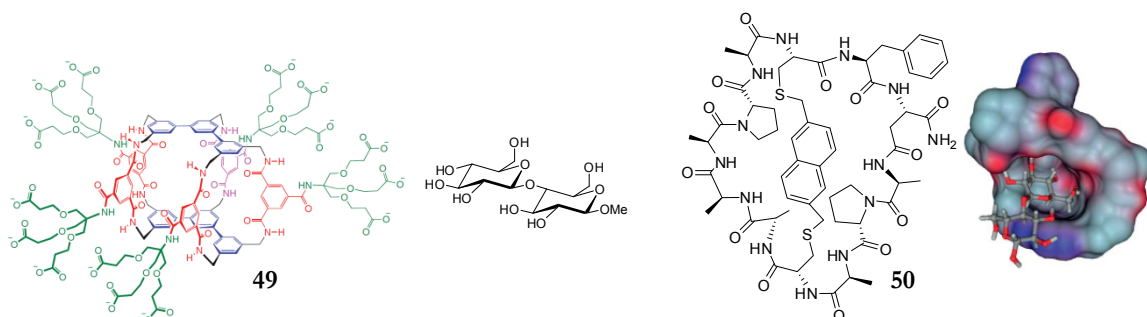


Abbildung 2-43: Links: Struktur des Rezeptors **49** von Davis und des Disaccharids Methyl-β-D-Cellobiose, welches mit 850 M^{-1} (mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt) am stärksten gebunden wird. From Y. Ferrand, M. P. Crump, A. P. Davis, *Science*, **2007**, 318, 619-622. Reprinted with permission from AAAS. **Rechts:** Struktur des Kohlenhydratrezeptors **50** von Meldal und die dreidimensionale Präsentation des Rezeptor-Cellobiose-Komplexes. Reprinted with permission from T. Reenberg, N. Nyberg, J. Duus, J. L. J. van Dongen, M. Meldal, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 30, 5003-5009. Copyright 2007 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Rezeptor **49** bindet in Wasser selektiv den gezeigten Zucker mit einer Bindungskonstante von 850 M^{-1} .^{119,120} Ein peptidischer Rezeptor auf dem Gebiet der Kohlenhydraterkennung ist der von Meldal und Mitarbeitern an der Festphase synthetisierte bicyclische Rezeptor **50**. ¹H-NMR-Titrationen ergaben für den 1:1 Rezeptor **50**-Cellobiose-Komplex, in einer Mischung von H₂O/AcOH (9:1), eine moderate Bindungskonstante von 7.7 M^{-1} .¹²¹ Ravoo und Mitarbeiter nutzen eine dynamisch kombinatorische Bibliothek zur Synthese und Identifikation von biomimetischen Kohlenhydratrezeptoren.¹⁹ Ein Satz von Tripeptidbausteinen der Form Cys-AS-Cys (AS = Arg, Asp, Glu, Gln, His, Ser, Thr, GABA, Phe, Trp oder Gly) wurde in Lösung unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4, NH₄HCO₃-Puffer) in Gegenwart verschiedener Mono- und Disaccharide durch einen reversiblen Sulfid-Austausch cyclisiert. Nach dem Prinzip einer dynamischen Bibliothek verschiebt sich durch Zugabe der Saccharide das Gleichgewicht zu dem cyclischen Peptid hin, welches mit dem zugegebenen Kohlenhydrat am stärksten wechselwirkt und daher durch die bindenden Wechselwirkungen stabilisiert wird. Mit dieser Methode identifizierten Ravoo und Mitarbeiter die in Abbildung 2-44 gezeigten cyclischen Peptide **51**, **52** und **53**.

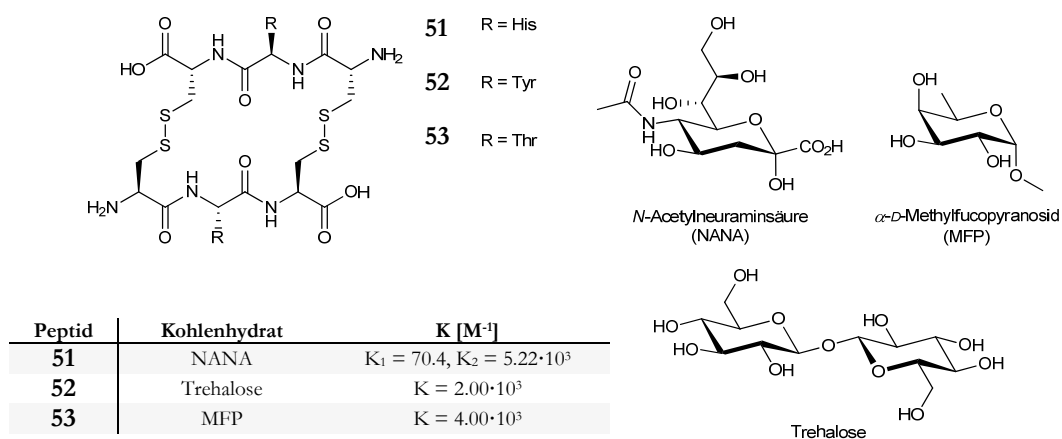


Abbildung 2-44: Struktur der Kohlenhydratrezeptoren **51**, **52** und **53** von *Ravoo*, die untersuchten Kohlenhydrate, die gebunden werden und die mittels NMR-Titration gemessenen Bindungskonstanten.

Mit Bindungskonstanten von $2.0\text{--}5.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ in Wasser (Phosphat-Puffer, pH 7.4) zählen die Kohlenhydratrezeptoren **51**, **52** und **53** zu den bisher effektivsten künstlichen Kohlenhydratrezeptoren.

Im Fall der Kohlenhydraterkennung durch künstliche Rezeptoren wie auch zuvor beschrieben bei der Diskussion der Nukleotidrezeptoren spielt die Ausnutzung der verschiedenen Wechselwirkungen in einem zum Teil vororganisierten Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Bindung. Erst die Kombination polarer Gruppen im Rezeptor mit aromatischen Bereichen in einer möglichst perfekten räumlichen Anordnung ermöglicht die Erkennung der Zucker im wässrigen Medium. Trotz der Vielzahl an künstlichen Kohlenhydratrezeptoren, die bisher schon synthetisiert wurden, bleiben auf dem Gebiet der Erkennung von Kohlenhydraten noch viele Fragen offen. Es bedarf noch viel Arbeit, besonders in Bezug auf die Synthese von Rezeptoren, die Kohlenhydrate effektiv im wässrigen Medium erkennen.

3. KONZEPTION UND ZIELSETZUNG

Die den biologischen Erkennungsprozessen zu Grunde liegenden Prinzipien beruhen in der Regel auf einer präorganisierten bzw. teilweise präorganisierten Kavität des Rezeptors, dem sogenannten „induced-fit“ und komplementär zum Substrat angeordneten funktionellen Gruppen, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen das Substrat binden. Wie die Beispiele in Kapitel 2 zur Erkennung von Nukleotiden (Kapitel 2.1.3) und Kohlenhydraten (Kapitel 2.3.2) in der Natur zeigen, besitzen natürliche Rezeptoren oft eine spaltenförmige oder auch höhlenartige Vertiefung als Bindungsstelle an der Oberfläche des Proteins. Innerhalb dieser Bindungsstelle findet die Erkennung des Substrats hauptsächlich über Wechselwirkungen mit dem Peptid-Rückgrat und den Seitenketten, der in der Bindungsstelle vorhandenen Aminosäuren statt. Zum Beispiel können Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (Phe, Tyr, Trp) zum Substrat bindende CH/ π - oder π - π -Wechselwirkungen ausbilden, während z. B. Aminosäuren mit polaren Seitenketten (Asp, Ser, Lys, Arg) ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brückenbindungen formen können. Röntgenkristallstrukturen von natürlichen Kohlenhydratrezeptoren belegen, dass sich am Boden und am Eingang der Bindungsstelle Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten (Phe, Tyr) befinden, die mit dem CH-Gerüst des Zuckers wechselwirken, wohingegen die umgebenden Seitenwände mit Aminosäuren mit polaren Seitenketten (Asp, Ser, Lys, Arg) versehen sind, die mit den Hydroxygruppen des Zuckers wechselwirken. Auch bei der Erkennung von Nukleotiden in der Natur ist es dieses Zusammenspiel der verschiedenen nicht-kovalenten Wechselwirkungen, das eine effiziente Bindung ermöglicht. Diese grundlegenden Prinzipien der chemisch-biologischen Erkennung ziehen sich in der Regel durch alle Erkennungsprozesse der Natur und sind somit auch für die Erkennung anderer biologischer Substrate zutreffend. Die Kombination vieler einzelner Wechselwirkungen in einer optimalen räumlichen Anordnung stellt eine vielversprechende Grundlage für das Design von effektiven und selektiven künstlichen Rezeptoren dar.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein allgemeines biomimetisches Konzept bzw. Design für Rezeptoren zu entwerfen, die in der Lage sind, ausgewählte biologische Substrate auf Grundlage der in natürlichen Bindungsstellen vorkommenden Prinzipien zu binden. Das Rezeptorkonzept soll nicht nur für ein einziges Substrat oder eine Substratgruppe maßgeschneidert werden. Vielmehr sollen Konzept und Synthesestrategie eine einfache strukturelle Anpassung des Rezeptors an eine Vielzahl von Substraten, durch den Austausch oder Einbau bindender funktioneller Gruppen, verwirklichen. Nach Entwicklung einer

Synthesestrategie und synthetischer Realisierung soll eine Einschätzung des Potentials des Rezeptorkonzepts durch erste Bindungsstudien mit ausgewählten Substraten - Polynukleotiden, Nukleotiden und Zuckern - vorgenommen werden.

Die Basis des Rezeptorkonzepts liegt in der Nachahmung natürlicher Bindungsstellen und der Anwendung der allgemeinen Grundlagen, die den Erkennungsprozessen der Natur zu Grunde liegen. Um effektiv und zweckmäßig angewendet zu werden, sollte ein solches Rezeptorkonzept verschiedene Anforderungen erfüllen:

- Bereitstellung einer präorganisierten Kavität
- Struktur, die eine räumlich optimale Erkennung des Substrats ermöglicht
- Bausteine, die in der Lage sind, die möglichen nicht-kovalenten Wechselwirkungen auszubilden
- Synthesestrategie, die ohne Veränderung der eigentlichen Synthesebedingungen eine Variation der Rezeptoren ermöglicht

Durch die Präorganisation der funktionellen Gruppen können erste wichtige Bindungen mit dem Substrat aufgebaut und enthalpische Verluste durch Reorganisation des Rezeptors beim Komplexieren des Substrats minimiert werden. Rezeptoren mit einer Kavität, die die räumliche Struktur der natürlichen Bindungsstellen nachahmt, besitzen den offensichtlichen Vorteil, dass sie das Substrat von mehreren Seiten umschließen. Durch eine räumlich optimale Erkennungsstrategie können möglichst viele Wechselwirkungen mit dem Substrat eingegangen werden und je mehr Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat bestehen, desto stärker ist die Bindung. Verbindung **54** stellt ein geeignetes Templat zur Erfüllung der geforderten Rezeptoreigenschaften dar (s. Abbildung 3-1). Es besitzt das Potential zur Präorganisation und die Möglichkeit durch Anbringung dreier Arme eine räumlich optimale Erkennung eines Substrats zu realisieren.

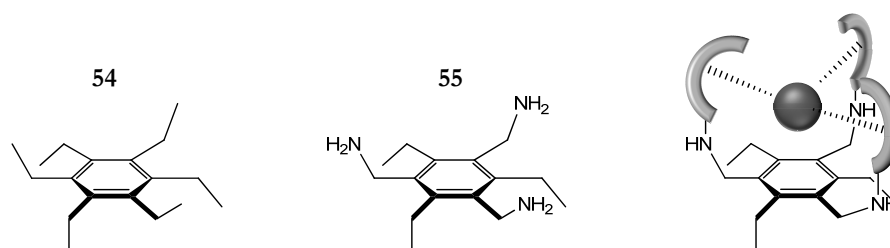


Abbildung 3-1: **Links:** Struktur des Templats **54**, dessen Ethylgruppen sich alternierend oberhalb und unterhalb der Ringebene anordnen. **Mitte:** Struktur des 1,3,5-Triethylamin-2,4,6-triethylbenzols **55**, dessen Aminogruppen sich als Anknüpfungsstellen für drei Rezeptorarme eignen, die die erforderliche präorganisierte Kavität bilden können. **Rechts:** Schematische Illustration eines Rezeptors und des strukturellen Konzepts der Substratkomplexierung.

Benzol-basierte dreiarmlige Rezeptoren wurden z. B. bereits in großem Umfang zur Bindung von Kation und Anionen¹²² und in geringerem Maße zur Erkennung von Kohlenhydraten^{123,124}

eingesetzt. Die sechs Substituenten des Templats **54** zeigen alternierend nach oben und unten^{125,126} und präorganisieren dadurch jeweils drei Arme auf je einer Seite des aromatischen Rings. Werden drei der Ethylarme, die sich auf einer Seite des Rings orientieren, z. B. mit Aminen funktionalisiert wie bei Templat **55**, können sie als Anknüpfungsstellen für drei Rezeptorarme dienen, die dann die geforderte Kavität bilden können (s. Abbildung 3-1). Durch das Templat wird zwar keine starre Präorganisation erzielt, aber es hat sich gezeigt, dass die Neigung, die Arme mit den bindenden Gruppen auf derselben Seite zu organisieren, etwa 10-15 kJ·mol⁻¹ Energiegewinn ermöglicht.¹²⁷

Da die grundlegende Idee des Konzepts darauf beruht, nicht nur eine Art von biologischen Substraten z. B. nur Kohlenhydrate zu binden, sondern verschiedene, sollte die synthetische Möglichkeit zur einfachen Variation der Substrat-bindenden funktionellen Gruppen bestehen. Durch die Variation der bindenden Gruppen kann sowohl die räumliche Anordnung als auch die Art der Wechselwirkungen des Rezeptors dem jeweiligen Substrat angepasst werden. Eine Möglichkeit zur Realisierung dieser Anforderungen an das Rezeptorsystem ist die Verwendung von Aminosäuren zum Aufbau der drei Rezeptorarme. Die Vorteile in der Verwendung von Aminosäuren liegen auf der Hand. Einerseits gibt es heute eine Vielzahl optimierter chemischer Synthesemethoden zum Knüpfen von Peptidbindungen, so dass für die Synthese der Rezeptorarme auf einen Grundstock von etablierten Methoden zurückgegriffen werden kann. Andererseits lassen sich mit den Aminosäuren selber die natürlichen Bindungsstellen am einfachsten nachahmen, wobei das komplette Repertoire an nicht-kovalenten Wechselwirkung ausgeschöpft werden kann. Zusätzlich können theoretisch neben den natürlichen Aminosäuren auch künstliche Aminosäuren integriert werden, deren Seitenketten aus Bausteinen bestehen, die gezielt bestimmte Gruppen des Substrats zu binden vermögen. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, die unterschiedlichsten Bindungsstellen in den Rezeptor an einer beliebigen Stelle innerhalb der Rezeptorarme einzubauen ohne eine neue Synthesestrategie verfolgen zu müssen. Ein weiterer Vorteil in der Wahl der Peptidchemie liegt darin, dass Rezeptoren nicht nur in Lösung sondern auch mit Hilfe der etablierten sogenannten Festphasenpeptidsynthese^{128,129} synthetisiert werden können. In der Festphasenpeptidsynthese werden die Peptide über einen spaltbaren Linker an einem unlöslichen Harz aufgebaut und nach Beendigung der Synthese von diesem abgespalten und im Anschluss gereinigt. Im Gegensatz zur Synthese in Lösung muss hier nicht nach jeder Kupplung einer Aminosäure das erhaltene Zwischenprodukt isoliert und gereinigt werden. Mit dieser Methode lassen sich peptidische Strukturen in der Regel wesentlich effizienter synthetisieren als in Lösung.

Abbildung 3-2 zeigt schematisch das zuvor diskutierte allgemeine Rezeptorkonzept und den daraus entwickelten allgemeinen strukturellen Aufbau der Rezeptoren.

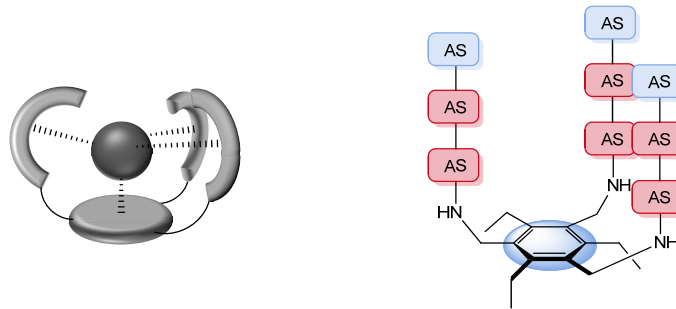


Abbildung 3-2: Links: Illustration des allgemeinen Rezeptorkonzepts. **Rechts:** Schematische Darstellung des allgemeinen strukturellen Aufbaus der Rezeptoren. Je nach Wahl der Bausteine bzw. Aminosäuren können polare oder unpolare Wechselwirkungen gebildet werden. Exemplarisch sind Bereiche bzw. Aminosäuren zur Ausbildung möglicher polarer (rot) und unpolarer (blau) Wechselwirkungen zur Erkennung eines Substrats, z. B. eines Kohlenhydrates, farbig dargestellt.

Die Länge der Rezeptorarme ist variabel und kann von einer bis zu drei oder auch mehr natürlichen oder künstlichen Aminosäuren variieren. Ebenso besteht die Möglichkeit, komplette peptidische Arme auch durch andere geeignete Bausteine, die Bindungsstellen für das potentielle Substrat darstellen, zu ersetzen.

Wie im Stand der Forschung im Falle verschiedener Rezeptoren diskutiert ermöglichen derartige Rezeptorsysteme ein besseres Verständnis der entsprechenden biologischen Erkennungsprozesse und helfen die entscheidenden bindenden Wechselwirkungen besser zu verstehen. Diese Erkenntnisse können als Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten oder medizinischen Therapien dienen.

Aufbauend auf dem vorgestellten Konzept zur Erkennung von biologisch relevanten Substraten folgt im anschließenden Kapitel die Entwicklung der konkreten Synthesestrategien für Rezeptoren in Lösung und an der festen Phase. Für die Umsetzung der Synthesestrategie ist eine Methodenentwicklung und gegebenenfalls eine Methodenoptimierung erforderlich. Abschließend sollen die synthetisierten Rezeptoren in Bindungsstudien auf ihr Potential zur Bindung ausgewählter biologischer Substrate getestet werden.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Entwicklung der Synthesestrategien

Computergestützte Kraftfeldrechnungen mit Modellrezeptoren, bestehend aus dem präorganisierten Templat **55** und den aus zwei bzw. drei Aminosäuren aufgebauten Rezeptorarmen, geben erste Anhaltspunkte über die Umsetzbarkeit des Konzepts und die erforderliche Länge der Rezeptorarme, um eine ausreichend große Kavität für eine optimale Bindung zu bilden (s. Abbildung 4-1).

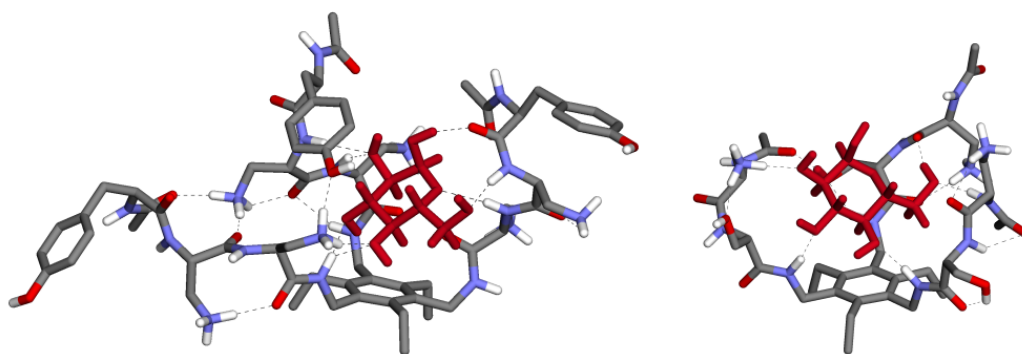


Abbildung 4-1: Computergestützte Kraftfeldrechnungen mit Modellrezeptoren (OPLS 2005 Kraftfeld in Wasser, 10000 Rechencyklen). Berechnete Strukturen der Modellrezeptoren mit drei identischen Armen, die aus je drei (links) bzw. zwei Aminosäuren (rechts) aufgebaut sind sowie Glucose als Substrat.

Die drei Rezeptorarme organisieren sich wie geplant auf einer Seite der Templat-Ringebene und bilden so die gewünschte Kavität zur Bindung des Substrats. Sowohl das Peptidrückgrat als auch die funktionellen Seitenkette bilden Wechselwirkungen mit dem Substrat aus. Der Modellrezeptor mit den aus drei Aminosäuren bestehenden Armen scheint aufgrund der längeren Arme das Substrat weiträumiger zu umschließen. Dennoch lassen die Berechnungen vermuten, dass auch Rezeptoren mit Armen aus zwei Aminosäuren zwar eine kleinere Kavität formen, diese aber ebenso zur Bindung der Substrate ausreichen könnte.

Zur Synthese symmetrischer Rezeptoren, d. h. Rezeptoren mit drei identischen Armen, in Lösung wurde die in Abbildung 4-2 gezeigte Synthesestrategie entwickelt.

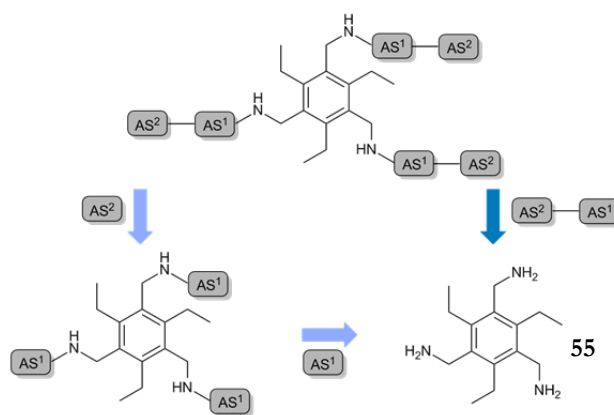


Abbildung 4-2: Retrosynthetische Illustration eines in Lösung synthetisierten symmetrischen Rezeptors. In diesem Beispiel sind die Rezeptorarme aus je zwei Aminosäuren aufgebaut. Mit farbigen Pfeilen sind die beiden Synthesewege markiert. Beide Synthesewege liefern die Rezeptoren mit identisch vielen Syntheseschritte. Für einen Rezeptor mit zwei Aminosäuren in den Armen sind drei bis vier Syntheseschritte notwendig, abhängig von der Wahl der Schutzgruppen und Aminosäuren.

Am ausgewählten, mit Aminen funktionalisierten Templat **55** kann die Verknüpfung der peptidischen Rezeptorarme über eine Standard-Peptidkupplung erfolgen. Eine mögliche Synthese des Templats **55** ist literaturbekannt.¹³⁰ Unter retrosynthetischen Gesichtspunkten ergeben sich zwei Möglichkeiten zum Aufbau der Rezeptoren. Eine Möglichkeit besteht darin, die Rezeptoren durch Kupplung der ersten Aminosäure an das Templat, gefolgt von der zweiten Aminosäure usw. zu synthetisieren. Eine zweite Möglichkeit ist zunächst die Synthese der kompletten Rezeptorarme, also die Verknüpfung der Aminosäuren untereinander. Anschließend werden diese Arme dann mit dem Templat verknüpft. Bei beiden Synthesewegen muss die Auswahl der für die Peptidsynthese nötigen Schutzgruppen sowohl der funktionellen Gruppen der Seitenketten als auch der nicht zu kuppelnden Amin- bzw. Carbonsäure-Gruppen bedacht werden. Bei der Auswahl der Schutzgruppen in den Seitenketten ist zu berücksichtigen, dass diese unter den synthetischen Bedingungen aller Syntheseschritte stabil sein müssen und erst im letzten Schritt der Rezeptorsynthese abgespalten werden. Da die Synthese vom C-Terminus zum N-Terminus erfolgt, bietet sich zur Schützung der nicht zu kuppelnden Amine die Boc-Schutzgruppe (*tert*-Butylcarbamat) an. Diese lässt sich im Säuren in der Regel quantitativ abspalten und das gewünschte Produkt ohne aufwändige Reinigung isolieren (s. Abbildung 4-3). Zur Schützung der Seitenketten der Aminosäure eignen sich zur Boc-Schutzgruppe orthogonale Schutzgruppen wie z. B. Phenylether zur Schützung von Hydroxyfunktionen oder Cbz-Schutzgruppen zur Schützung von Aminfunktionen (s. Abbildung 4-3). Beide Schutzgruppen lassen sich hydrogenolytisch abspalten.

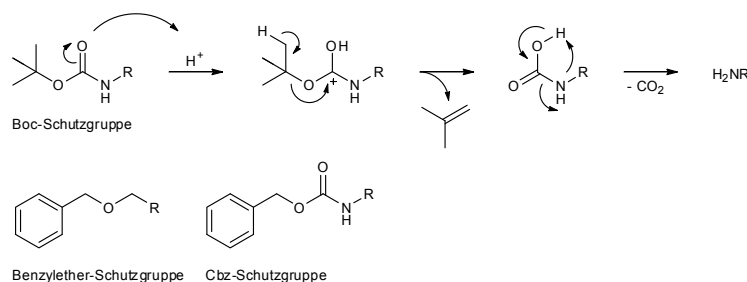


Abbildung 4-3: Mechanismus der Boc-Entschützung. Struktur der Phenylether- und Cbz-Schutzgruppe.

Der Vorteil der in Abbildung 4-2 beschriebenen Synthesestrategien liegt in ihrer synthetischen Einfachheit. Rezeptoren mit Rezeptorarmen, die aus zwei Aminosäuren aufgebaut sind, lassen sich in drei bis vier Syntheseschritten herstellen. Die einzelnen Bausteine lassen sich mit relativ geringem Aufwand herstellen bzw. sind im Falle der geschützten Aminosäuren käuflich erhältlich. Weiterhin sind die Synthesemethoden für Peptidkupplungen gut erforscht und sowohl Standardsynthesemethoden als auch alternative Methoden bereits etabliert. Allerdings weisen die in Abbildung 4-2 gezeigten Synthesestrategien auch einen Nachteil auf. Da das Templat **55** als ungeschütztes Triamin vorliegt, erfolgt der Aufbau bzw. die Verknüpfung der drei Rezeptorarme parallel. Dadurch bedingt sind alle drei Arme des Rezeptors identisch. Dies schränkt die Vielfalt der eingebauten Aminosäuren und damit auch die Arten der verschiedenen Wechselwirkungen ein.

Um in Lösung unsymmetrische Rezeptoren, d. h. Rezeptoren mit unterschiedlichen Armen, z. B. mit zwei gleichen und einem unterschiedlichen Arm zu synthetisieren, ist ein synthetisch aufwendigeres orthogonal geschütztes Templat **56** erforderlich (s. Abbildung 4-4). Ein möglicher Syntheseweg für Templats **56** ist bereits literaturbekannt.¹³¹

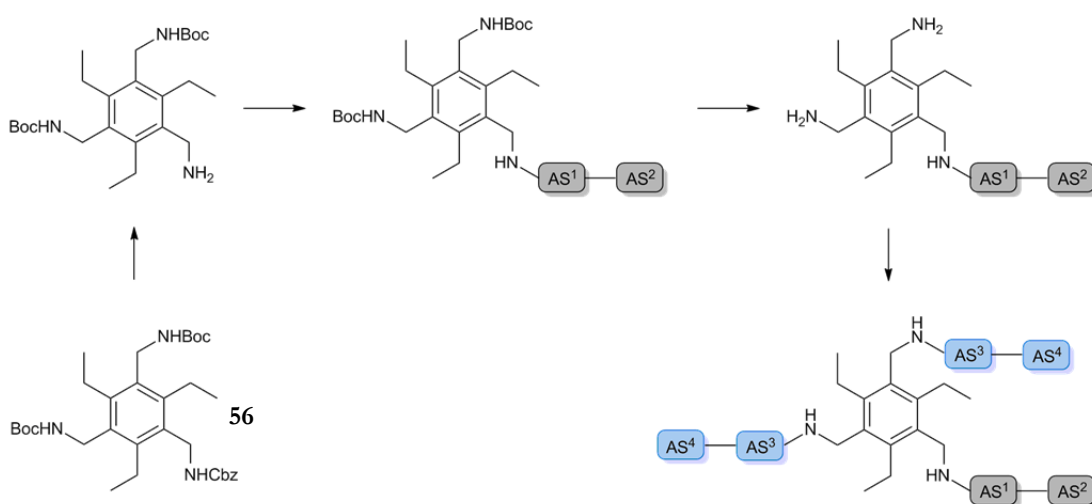


Abbildung 4-4: Mit zwei Boc-Schutzgruppen und einer Cbz-Schutzgruppen orthogonal geschütztes Templat **56** zur Synthese von Rezeptoren mit unterschiedlichen Armen in Lösung. Illustration der Synthese der Rezeptoren mit zwei gleichen und einem unterschiedlichen Arm.

Nach Entschützung der Cbz-Schutzgruppe von **56** kann der erste Arm synthetisch aufgebaut bzw. verknüpft werden. Bei der Wahl der Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten des ersten Arms ist zu beachten, dass diese unter den Entschützungsbedingungen der Boc-Schutzgruppen des Templats stabil sein müssen. Nach anschließender Entschützung der Boc-Gruppen kann der Aufbau der verbleibenden zwei identischen Arme folgen (s. Abbildung 4-4). Aufgrund der komplexeren Schutzgruppenstrategie ist die Synthese der unsymmetrischen Rezeptoren in Lösung aufwendiger und erfordert für den Fall, dass die Rezeptorarme aus je zwei Aminosäuren bestehen, sieben bis acht Syntheseschritte statt drei bis vier wie im Fall der symmetrischen Rezeptoren.

Eine effiziente Alternative für die Synthese solcher peptidischer Strukturen mit mehreren Kupplungsschritten in Lösung stellt die Festphasensynthese dar (s. Abbildung 4-5).

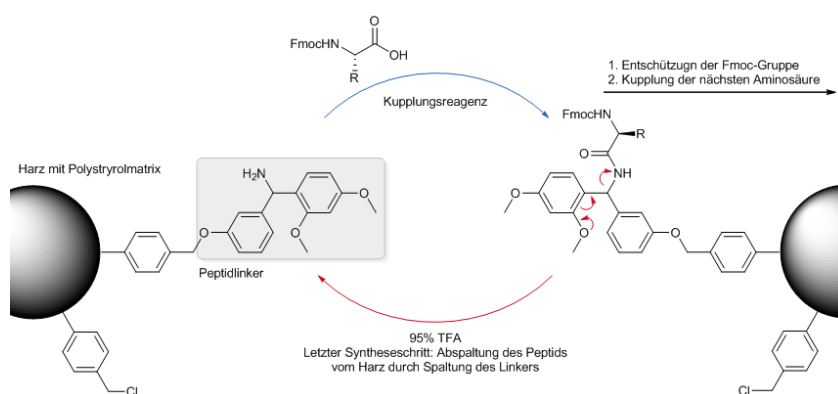


Abbildung 4-5: Illustration des Prinzips der Festphasenpeptidsynthese. Das Rink-Amid Harz auf Polystyrolbasis ist mit einem säurelabilen Benzhydrylaminlinker versehen.

Die Synthese von Peptiden an der Festphase nach dem Standard-Fmoc-Protokoll erfolgt vom C- zum N-Terminus. Hierfür ist der N-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen, die sich unter milden basischen Bedingungen mit 20 % Piperidin in Dimethylformamid abspalten lässt. Die Seitenketten der Aminosäuren können durch *t*-Butyl-, Boc- oder Cbz-Gruppen geschützt sein, welche bis zum Ende der Synthese nicht abgespalten werden und unter den Bedingungen der Fmoc-Entschützung stabil sind. Der ungeschützte C-Terminus wird mit Hilfe von Kupplungsreagenzien wie z. B. HCTU oder PyBOB über Bildung eines Aktivesters an die Festphase gekuppelt. Die Festphase ist ein funktionalisiertes Polymer, das in Form kleiner Kugeln vorliegt und als Harz bezeichnet wird. Die Harze für die Festphasensynthese nach dem Standard-Fmoc-Protokoll besitzen als funktionelle Gruppen in der Regel entweder freie oder Fmoc-geschützte Amine. Die funktionellen Gruppen sind über Linker an das Polymer gebunden. Durch Spalten dieser Linker kann das an der Festphase aufgebaute Peptid vom Polymer getrennt und isoliert werden. Abhängig vom Linker können die Abspaltbedingungen variieren. Beispielsweise wird

beim sogenannten Rink-Amid-Harz das synthetisierte Peptid mit 50 % TFA in Dichlormethan unter relativ milden sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. Abbildung 4-6 zeigt die bereits in meiner Diplomarbeit¹³² entwickelte Synthesestrategie für die Synthese der Rezeptoren an der festen Phase mit Templat **57**. Die Festphasensynthese ermöglicht einen effizienten Aufbau der peptidischen Rezeptorstrukturen, benötigt aber aufgrund der Synthesestrategie ein modifiziertes Templat **57**.

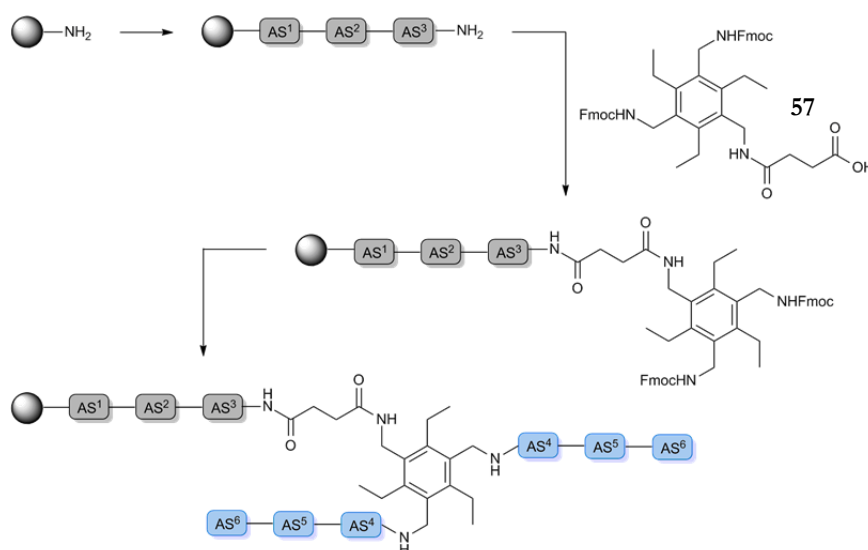


Abbildung 4-6: Illustration der Synthesestrategie für die Synthese der Rezeptoren an der festen Phase. Die Festphasensynthese ermöglicht einen effizienten Aufbau der peptidischen Rezeptorstrukturen, benötigt aber aufgrund der Synthesestrategie ein modifiziertes Templat **57**.

Die Festphasensynthese der Rezeptoren beginnt am oberen Ende des einen Arms und der Aufbau erfolgt durchgehend in eine Richtung nach dem Standard-Fmoc-Protokoll vom C- zum N-Terminus. Um das Triamintemplat **55** unter den Bedingungen des Standard-Fmoc-Protokolls kuppeln zu können, muss eine der Aminfunktionen des Templats in eine kuppelbare Säurefunktion, z. B. mit Bernsteinsäureanhydrid, umfunktionalisiert und die verbleibenden freien Amine mit Fmoc-Schutzgruppen versehen werden. Templat **57** kann mit dem ersten, an der Festphase aufgebauten, Arm verknüpft und anschließend die zwei verbleibenden Arme mit anderen Aminosäuren als im ersten Arm aufgebaut werden. Nach Abspaltung vom Harz kann auf diesem Weg der gewünschte unsymmetrische Rezeptor erhalten werden.

Abbildung 4-7 stellt zusammenfassend nochmal die drei Strategien zur Synthese der symmetrischen und unsymmetrischen Rezeptoren in Lösung und an der Festphase dar. In Lösung sollen nach der ersten Synthesestrategie mit Templat **55** symmetrische Rezeptoren synthetisiert werden. Ebenfalls in Lösung sollen mit Hilfe der zweiten Strategie unsymmetrische Rezeptoren mit Templat **56** realisiert werden. Die dritte Synthesestrategie soll mit Templat **57** die Synthese unsymmetrischer Rezeptoren an der Festphase ermöglichen.

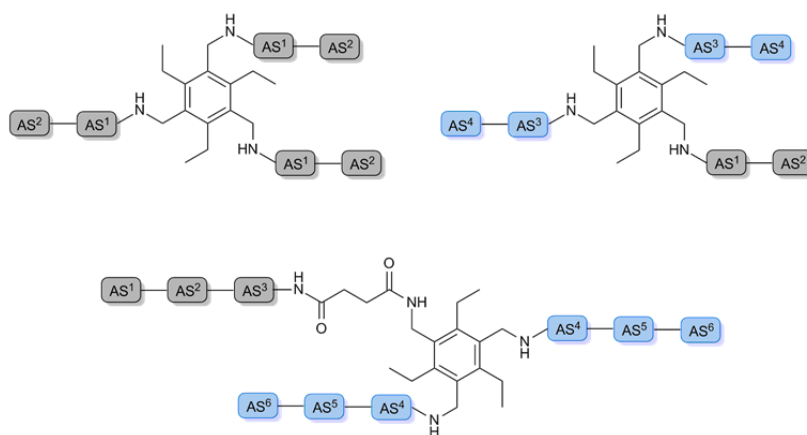


Abbildung 4-7: Schematische Illustration der drei Strategien zur Synthese der symmetrischen und unsymmetrischen Rezeptoren, die sowohl in Lösung als auch an der Festphase synthetisiert werden sollen.

Im folgenden Kapitel werden nach den vorgestellten Synthesestrategien zunächst die Methodenentwicklung und Synthese eines unsymmetrischen Rezeptors an der Festphase und anschließend die Synthesen einer Auswahl von symmetrischen und unsymmetrischen Rezeptoren in Lösung beschrieben und diskutiert. Die verschiedenen in Lösung synthetisierten Rezeptoren besitzen einen bis drei Arme, während der an der Festphase synthetisierte Rezeptor drei Arme bestehend aus je drei Aminosäuren besitzt.

4.2 Synthesen der Rezeptoren

4.2.1 Synthesen an der Festphase

Im Rahmen meiner Diplomarbeit¹³² wurde die in Abbildung 4-6 gezeigte Synthesestrategie entwickelt. Wie in der Abbildung 4-8 zu sehen wurde der Aufbau des Rezeptors am Rink-Amid Harz begonnen. Die Auswahl der Aminosäuren wurde aufgrund ihres Vorkommens in natürlichen Kohlenhydratbindungsstellen getroffen. Die Anordnung der Aminosäuren erfolgte biomimetisch, um die polaren und unpolaren Bereiche in natürlichen Bindungsstellen nachzuahmen. Die Kupplung der Aminosäuren des ersten Armes erfolgte in Dimethylformamid mit HCTU als Kupplungsreagenz und *N*-Methylmorpholin als Base. Die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20 %iger Piperidinlösung in Dimethylformamid erreicht. Nach Kupplung des Templats **57** konnten anschließend die beiden restlichen Arme mit anderen Aminosäuren als im ersten Arm aufgebaut werden. Jeder Kupplungsschritt wurde mindestens zweimal durchgeführt und die Umsetzung der Kupplung mittels *Kaisertest*¹³³ zum Nachweis freier Amine verfolgt. Nach beendeter Synthese am Harz wurde der Rezeptor mit einer Abspaltlösung bestehend aus 95 % Trifluoressigsäure und 5 %

Dichlormethan vom Harz abgespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen der funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten entfernt.

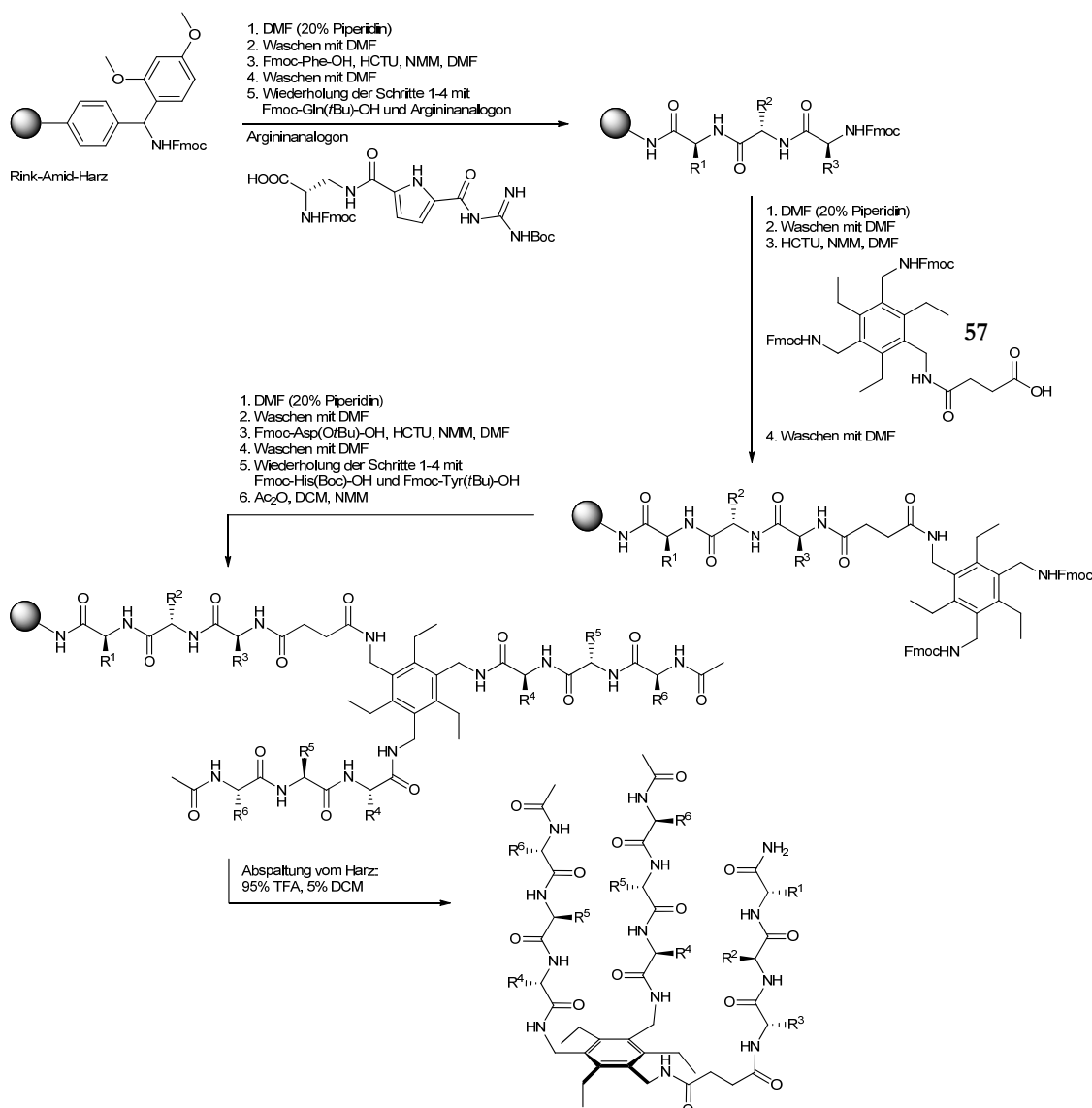
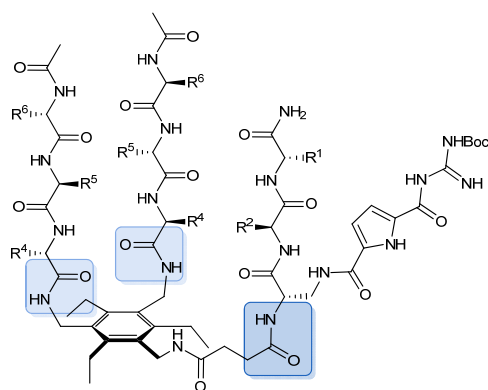


Abbildung 4-8: Detailliertes Syntheschema der Synthese eines Rezeptors an der festen Phase. (R^1 = Phe, R^2 = Gln, R^3 = künstliche AS mit Argininanalogon in der Seitenkette, R^4 = Asp, R^5 = His, R^6 = Tyr, alle Aminosäuren besitzen S -Konfiguration; Kupplungsbedingungen: HCTU, NMM, DMF; Abspaltbedingungen: 95 % TFA, 5 % DCM)

Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch untersucht. Die erhaltenen UV-Spektren der HPLC-Läufe zeigten jedoch, dass kein Hauptprodukt, sondern eine Vielzahl von Nebenprodukten entstanden war. Die Wahl der Kupplungsbedingungen ist nicht optimal, da offensichtlich einige der Kupplungsschritte mit sehr schlechten Ausbeuten verlaufen bzw. nicht geglückt sind. Um das gewünschte Produkt in guten Ausbeuten und großer Reinheit zu erhalten, ist es erforderlich, dass jeder der einzelnen Kupplungsschritte mit nahezu quantitativen Ausbeuten verläuft. Am Rechenbeispiel in Abbildung 4-9 lässt sich demonstrieren wie sich Kupplungsschritte mit moderaten Ausbeuten auf die Gesamtausbeute und die Reinheit

auswirken. Bei einem Molekül mit acht Kupplungsschritten, bei dem jeder Kupplungsschritt mit einer Ausbeute von 95 % verläuft, ergibt sich eine theoretische Ausbeute für die gesamte Synthese von 66 %. Verlaufen theoretisch auch nur zwei der acht Kupplungsschritte mit einer Ausbeute von 60 % anstatt von 95 % so verringert sich die theoretische Gesamtausbeute auf 26 % und in Konsequenz fallen eine Vielzahl von Nebenprodukten an.



- 8 Kupplungsschritte:
theoretische Gesamtausbeute (bei 95 %
pro Schritt) = 66 %
- 2 mögliche kritische Kupplungsschritte:
theoretische Gesamtausbeute (bei 60 %
pro kritischem Schritt) = 26 %

Abbildung 4-9: Demonstration der Wichtigkeit möglichst quantitativ verlaufender Kupplungen während der Festphasensynthese. Verlaufen nur zwei der acht Kupplungsschritte, z. B. die Kupplung des Templates **57** und die Kupplung der darauffolgenden Aminosäure mit geringer Ausbeute, verschlechtert sich die Gesamtausbeute signifikant.

Um nun im Rahmen der Doktorarbeit die Synthese des Rezeptors an der Festphase zu ermöglichen, sollte einerseits die Synthese in Bezug auf die Auswahl der Aminosäuren bzw. der Bausteine so einfach wie möglich gehalten werden und andererseits die problematischeren Kupplungen identifiziert und für diese Schritte verbesserte Bedingungen ermittelt werden.

Zunächst wurden Aminosäuren ausgewählt, die sich problemlos ohne schlechte Ausbeuten, Racemisierung oder andere Nebenreaktionen, kuppeln lassen sollten. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die ausgewählten Aminosäuren im Rezeptor auch ihre Rolle bezüglich der vielen nicht-kovalenten Wechselwirkungen erfüllen können. Aus diesem Grund wurden zunächst Phenylalanin, Serin und Glycin ausgewählt. Alle drei Aminosäuren sollten sich in guten Ausbeuten und ohne Nebenreaktionen kuppeln lassen.¹²⁹ Abbildung 4-10 zeigt den resultierenden Rezeptor **58**.

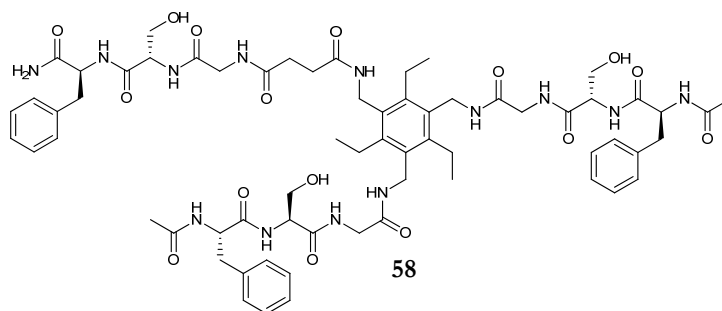


Abbildung 4-10: Struktur des Rezeptors **58**.

Das aromatische Templat in der Mitte und die drei Phenylalanine am Ende jeden Armes ahmen den aromatischen Boden und Eingang natürlicher Bindungsstellen nach. Die Seitenketten des Serins hingegen können polare Wechselwirkungen ausbilden. Zusätzlich wurde versucht, anstelle des geschützten Bausteins **57** nur das Triamin **55** ohne Schutzgruppen zu kuppeln. *Anslyn* und Mitarbeiter kuppelten bei ihrer Synthese eines Nukleotidrezeptors ebenfalls das ungeschützte Triamin über einen Linker an die feste Phase.²³ Sollte die Kupplung des Templatmotivs auf diesem Wege erfolgreich verlaufen, könnte die mehrstufige Synthese des Bausteins **57** umgangen werden.

Abbildung 4-11 zeigt den Syntheseweg und beschreibt die Kupplungsbedingungen im Detail. Der erste Arm des Rezeptors wurde am Rink-Amid-Harz synthetisiert. Nach Kupplung der dritten Aminosäure (Gly) und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das freie Amin mit Bernsteinsäureanhydrid zur freien Säure umfunktionalisiert. Anschließend wurde das Triamin **55** ohne Schutzgruppen gekuppelt und mit dem Aufbau der restlichen zwei Arme fortgefahren.

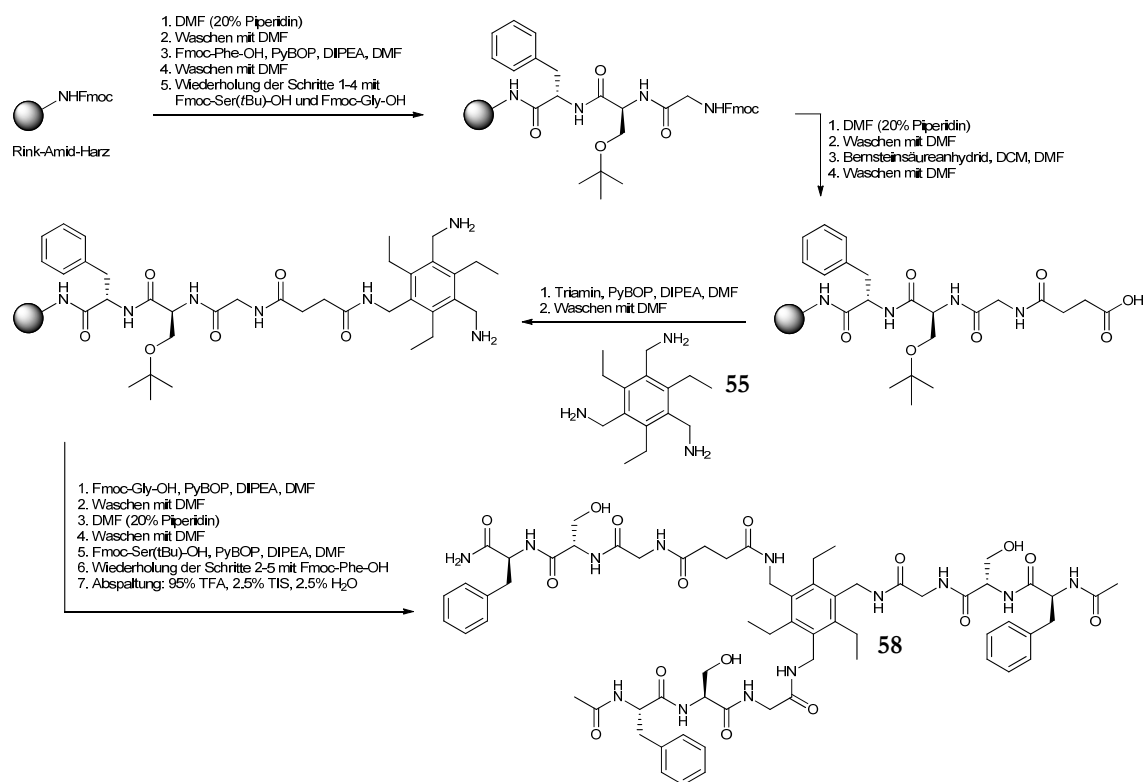


Abbildung 4-11: Syntheseversuch des Rezeptors **58**, bei dem versucht wurde den Templatbaustein als freies Triamin **55** zu kuppeln. Die Kupplung der Aminosäuren an das Rink-Amid-Harz (100 mg, Beladung: 0.94 mmol·g⁻¹) erfolgte jeweils mit 4.00 Äq. AS, 4.00 Äq. PyBOP und 10.0 Äq. DIPEA in 5.00 ml DMF über Nacht. Bernsteinsäureanhydrid wurde mit 10.0 Äq. in DCM/DMF (1/1) umgesetzt. Das Waschen nach jeder Kupplung erfolgte sechsmal mit je 5.00 ml DMF. Die anschließende Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurde zweimal für 20 min mit 10.0 ml Piperidin (20 %)/DMF-Lösung durchgeführt. Abspaltbedingungen: 95 % TFA, 2.5 % TIS, 2.5 % H₂O. Waschvorgang nach dem Abspalten: dreimal DCM, zweimal MeOH, zweimal Et₂O, dreimal DCM. Die Vollständigkeit der Kupplungsreaktionen wurde mit dem *Kaisertest*¹³³ bzw. Malachitgrüntest¹³⁴ zur Detektion freier Säuregruppen am Harz überprüft.

Nach dem Abspalten vom Harz zeigten die massenspektrometrischen und HPLC-Untersuchungen des Abspaltprodukts, dass die Kupplung des ungeschützten Triamins nur bedingt möglich ist.

Abbildung 4-12 zeigt den HPLC-Lauf des Abspaltprodukts. Es sind drei Hauptpeaks im Verhältnis von etwa 1:1:0.7 zu erkennen.

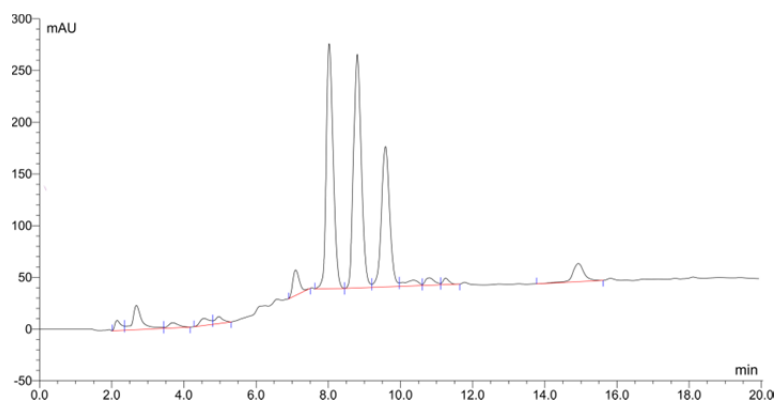


Abbildung 4-12: UV-Spektrum des HPLC-Laufs des Abspaltprodukts der Festphasensynthese des Rezeptors **58**. Säule: RP18-Material, 150 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm; Laufbedingungen: Gradient über 15 min, 50 % bis 100 % Methanol (0.05 % TFA-Zusatz); Flussrate: 0.43 ml \cdot min $^{-1}$; Detektion bei 220 nm.

Die massenspektrometrische Untersuchung des Abspaltprodukts zeigt, dass Triamin **55** nicht nur mit einer freien Säurefunktion des am Harz aufgebauten Rezeptorarms reagiert sondern mit zweien bzw. dreien. Dies führt zu den in Abbildung 4-13 gezeigten gewünschten Produkt und zwei weiteren Nebenprodukten.

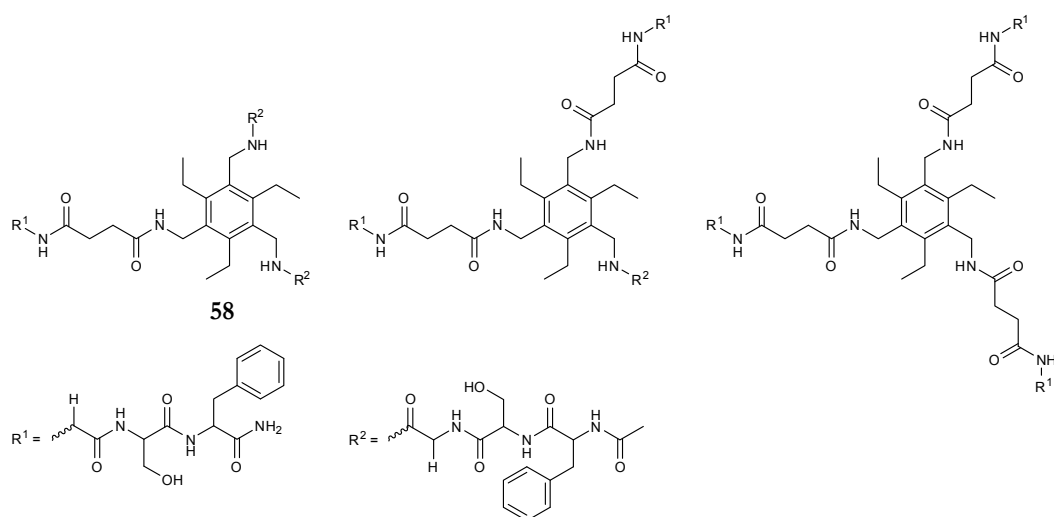


Abbildung 4-13: Strukturen des gewünschten Produkts **58** und der zwei Nebenprodukte, die mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchung identifiziert werden konnten.

Der Grund, warum im Gegensatz zum Literaturbeispiel in diesem Fall die Kupplung des freien Triamins nicht zum Erfolg führt, liegt möglicherweise in der Länge des bereits synthetisieren Arms. Im Literaturbeispiel befindet sich zwischen Triamin und Harz nur eine

Aminosäure während sich hier drei Aminosäuren und der Bernsteinsäurebaustein zwischen Triamin und Harz befinden. Dies sorgt vermutlich für eine größere Flexibilität, so dass bereits gekuppeltes Triamin in die Nähe freier Carbonsäurefunktionen kommen und nochmals reagieren kann.

Da die Kupplung des ungeschützten Triamin unter diesen Bedingungen nicht ohne Nebenreaktionen möglich ist, wurde versucht, die Synthese für Baustein **57** zu optimieren. Abbildung 4-14 zeigt den Syntheseweg der während meiner Diplomarbeit¹³² entwickelt wurde.

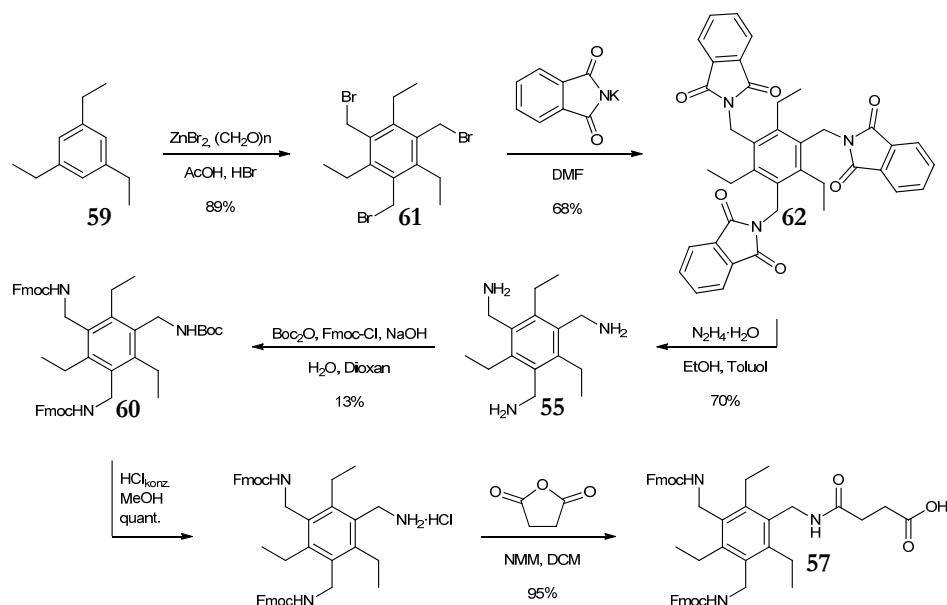


Abbildung 4-14: Schema der in der Diplomarbeit¹³² entwickelten Synthesestrategie für Baustein **57**, ausgehend von 1,3,5-Triethylbenzol **59** über sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von 5 %.

Die in der Diplomarbeit entwickelte Synthesestrategie ermöglicht die Synthese von Baustein **57**, ausgehend von 1,3,5-Triethylbenzol **59** über sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von 5 %. Da Verbindung **57** aber für die Festphasensynthese in relativ großen Mengen benötigt wird und der Syntheseschritt der Schützung nur mit 13 % Ausbeute verläuft, wurde im Rahmen der Doktorarbeit ein neuer Syntheseweg entwickelt, der ohne statistische Schützung und mit besseren Ausbeuten auskommen soll (s. Abbildung 4-15).

Für die in der Diplomarbeit entwickelte Synthesestrategie wurde Tribromid **61** in einer Blanc-Reaktion durch Umsetzung des kommerziell erhältlichen Triethylbenzols **59** mit Zinkbromid und Paraformaldehyd in einer 30 %igen Bromwasserstoff/Essigsäure-Lösung in sehr guter Ausbeute erhalten. Die Umsetzung des Tribromids **61** zum Triamin **55** erfolgte über Reaktion mit Kaliumphthalimid in DMF zum Triphthalid **62** gefolgt von der Reduktion zum Triamin mit Hydrazinhydrat.^{135,136} Die darauffolgende orthogonale Schützung des Triamins erfolgte durch Zutropfen von Boc-Anhydrid und Fmoc-Cl im Verhältnis 1:2 jeweils gelöst in Dioxan sowie Natriumhydroxid gelöst in Wasser. Die Natriumhydroxidlösung wurde zugetropft, um

die entstehenden Säuren abzufangen, die ansonsten eventuell zur Entschützung der Boc-Gruppe führen könnten. Die Reaktionsbedingungen bedingen das Entstehen von vier Produkten mit einer statistischen Verteilung der Schutzgruppen. Nachdem die DC-Kontrolle eine vollständige Umsetzung des Edukts anzeigte, wurde die Reaktionslösung destillativ vom Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand chromatographisch gereinigt. Durch das ähnliche Elutionsverhalten des Produkts und der drei Nebenprodukte bei der chromatographischen Reinigung mussten mindestens zwei chromatographische Reinigungsschritte durchgeführt werden, so dass das gewünschte Produkt **60** aufgrund der Reinigung und der statistischen Schätzung in einer Ausbeute von nur 13 % erhalten wurde. Die anschließende Entschützung der Boc-Gruppe mit konzentrierter Salzsäure in Methanol als Lösemittel erfolgte quantitativ. Die darauffolgende Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid zum Baustein **57** wurde mit *N*-Methylmorpholin in Dichlormethan bei Raumtemperatur durchgeführt und Verbindung **57** in einer Ausbeute von 95 % isoliert.

Die im Rahmen der Doktorarbeit neu entwickelte, effektivere Synthese des Bausteins **57** erfolgte ebenfalls ausgehend von Triethylbenzol **59** (s. Abbildung 4-15).

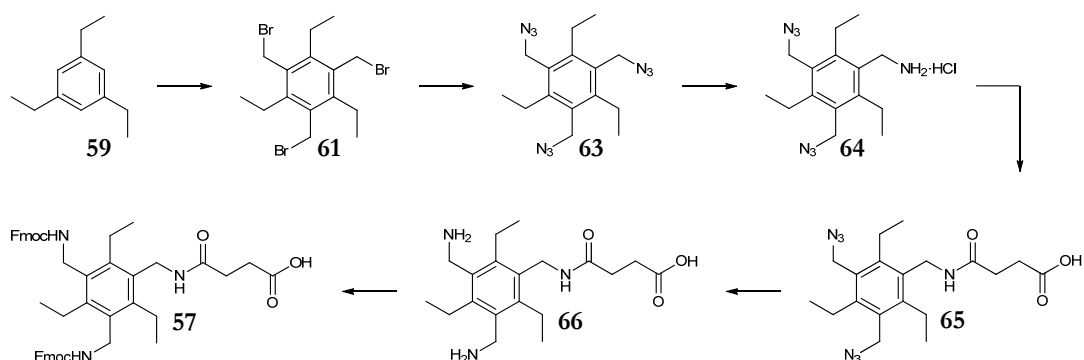


Abbildung 4-15: Neue Synthesestrategie zur Synthese des für die Festphasensynthese benötigten Bausteins **57**.

Die Synthese des Tribromids **61** erfolgte wie zuvor beschrieben in einer Blanc-Reaktion. Die darauffolgende Substitution der Bromide durch Azidgruppen erfolgte in einer nukleophilen Substitution durch Umsetzung des Tribromid **61** mit Natriumazid in Dimethylformamid bei 70 °C. Nach Ausfällen mit Wasser wurde das Triazid **63** in einer Ausbeute von 90 % erhalten (s. Abbildung 4-16).

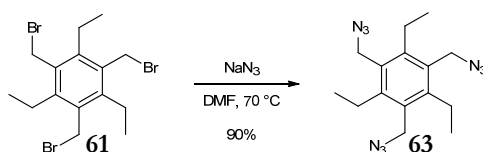


Abbildung 4-16: Umsetzung des Tribromids **61** zum Triazid **63** durch nukleophile Substitution mit Natriumazid.

Bei der Durchführung der Reaktion wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das eingesetzte Tribromid **61** säurefrei war, da in saurer Lösung die explosive Stickstoffwasserstoffsäure entsteht.

Um eine selektive Schützung zu ermöglichen, ist es erforderlich, dass nur eines der Azide reduziert wird. Dies wurde durch eine Staudinger Reaktion in einem Zweiphasensystem aus Ether und 5 %iger Salzsäure erreicht.¹³⁷ Triazid **63** und Triphenylphosphin lösen sich in der organischen Ethyletherphase, während ein einfach reduziertes Edukt durch die Salzsäure protoniert und dadurch in der wässrigen Phase löslich wird. Durch das Überführen des monoreduzierten Edukts in die wässrige Phase wird es dem Reduktionsmittel entzogen, so dass eine Reduktion der beiden verbleibenden Azidgruppen verhindert werden sollte. Durch anschließendes Trennen der zwei Phasen kann das monoreduzierte Edukt **64** isoliert und anschließend selektiv weiter umgesetzt werden. Zur Durchführung der Reaktion wurde Triazid **63** in Diethylether gelöst, mit 5 %iger Salzsäure versetzt und unter Rühren des Zweiphasensystems wurde Triphenylphosphin gelöst in Diethylether über fünf Stunden zuge tropft. Zur Reinigung wurden die Phasen getrennt, die organische Phase extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen nach Trocknen mit Natriumsulfat lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt **64** wurde anschließend chromatographisch gereinigt. Mit Diethylether als organische Phase wurde jedoch nur eine Ausbeute von 19 % erzielt, da neben der Monoreduktion auch Zweifach- und Dreifachreduktionen stattfinden. Die Reduktion des Azids bei der Staudinger Reaktion verläuft zunächst über ein cis-konfiguriertes Phosphazid, aus dem konzertiert schließlich Stickstoff abgespalten wird. Das entstehende Phosin-Imin wird anschließend zum Amin hydrolysiert (s. Abbildung 4-17).

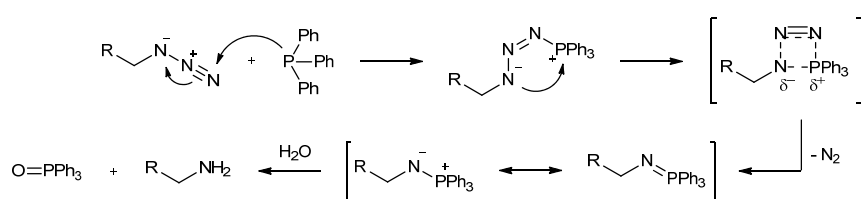


Abbildung 4-17: Mechanismus der Staudinger Reaktion mit Triphenylphosphin.

Da diese Reaktion im organischen Lösemittel abläuft und die Hydrolyse im Hinblick auf die erwünschte Monoreduktion für die Reaktion entscheidend ist, wurde versucht, die Ausbeute durch die Verwendung verschiedener Lösemittel zu optimieren (s. Tabelle 4-1).

Nr.	Lösemittel	Ausbeute	Bedingungen/Anmerkung
1	Et ₂ O/Essigester 8/2	22 %	
2	MTBE	12 %	
3	Toluol	10 %	
4	Et ₂ O	10 %	Refluxieren (40 °C), 6 h
5	Et ₂ O/Essigester 9/1	48 %	Refluxieren (45 °C) 11 h
6	Et ₂ O/Essigester 9/1	29 %	Refluxieren, Mikrowelle (20 W, T _{max} = 35 °C) 2h

Tabelle 4-1: Unterschiedliche Bedingungen zur Optimierung der Monoreduktion des Triazids **63** zum Produkt **64**.

Abhängig vom Lösemittel lässt sich die Löslichkeit der Zwischenprodukte und des Produkts in den beiden Phasen verändern, so dass zum Beispiel der Übergang des Produkts von der organischen in die wässrige Phase bzw. die Hydrolyse des Phosphin-Imins begünstigt wird. Sollte das Phosphin-Imin nicht schnell genug hydrolysiert und in die wässrige Phase überführt werden, kann es mit weiterem Triphenylphosphin reagieren und somit zu zweifach und dreifach reduzierten Nebenprodukten führen. Um die Hydrolyse und die Löslichkeit zu beeinflussen, wurden dem Diethylether Lösemittel unterschiedlicher Polarität und mit unterschiedlichem Potential Wasser zu lösen beigefügt. Der Diethylether konnte nur zu kleinen Teilen mit anderen Lösemitteln versetzt werden, da ansonsten das Triazids und das Triphenylphosphin nicht mehr vollständig löslich waren. Die Eigenschaften der gewählten Lösemittel sind in Abbildung 4-18 dargestellt.

KW	Ether	Halogen-KW	Ester	Alkohole	Wasser	Lösemittel	Polaritätsindex <i>P</i>
						Toluol	2.4
						Methyl- <i>tert</i> -butylether	2.5
						Diethylether	2.8
						Essigester	4.4

Abbildung 4-18: Auszug aus der elutropen Reihe der Lösemittel. Es wurde der Polaritätsindex nach *Snyder* verwendet. Allgemeine Einordnung der Lösemittel nach ihrer Polarität und Hydrophilie.¹³⁸

Zunächst wurde vermutet, dass Toluol und Methyl-*tert*-butylether (MTBE) mit einem Polaritätsindex von 2.4 bzw. 2.5 die Polarität des Diethylether (2.8) verringern könnten und somit das Lösen des Produkts in der wässrigen Phase begünstigen und die Ausbeute verbessern. Allerdings verschlechtert sich sowohl durch den Zusatz von Toluol als auch durch den Zusatz von Methyl-*tert*-butylether die Ausbeute auf 10 % bzw. 12 %. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass der entscheidende Schritt für die Ausbeute die Hydrolyse ist. Da Essigester polarer ist als Diethylether und auch mehr Wasser aufnehmen kann, wurde stattdessen Essigester zur Reaktionslösung hinzugefügt und zusätzlich im Ölbad bzw. per Mikrowelle erhitzt (Tabelle 4-1 Nr. 5 und 6). Die Reaktionen wurden per HPLC-Kontrolle verfolgt. Im direkten Vergleich war zu erkennen, dass der Anteil der Nebenprodukte bei Durchführung der Reaktion in der Mikrowelle deutlich erhöht war. Das Verhältnis des

zweifach bzw. dreifach reduzierten Nebenprodukts zum Produkt **64** war bei Durchführung der Reaktion in der Mikrowelle doppelt so groß wie unter Refluxieren ohne Mikrowellenbestrahlung. Wie in Tabelle 4-1 zu sehen erwiesen sich die Bedingungen in Versuch Nr. 5 mit einer Ausbeute von 48 % als die geeignetsten (s. Abbildung 4-19). Als Nebenprodukte wurden dennoch sowohl die zweifach als auch dreifach reduzierte Verbindung erhalten.

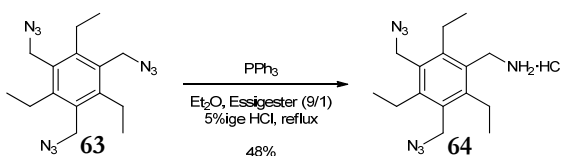


Abbildung 4-19: Optimierte Bedingungen für die Reaktion des Triazids **63** zum monoreduzierten Produkt **64** im Zweiphasensystem.

Um in der Festphasensynthese gekuppelt werden zu können, wurde Amin **64** im nächsten Syntheseschritt durch Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid in eine Säurefunktion umfunktionalisiert. Die monoreduzierte Verbindung **64** wurde mit Diisopropylethylamin und Bernsteinsäureanhydrid in Dichlormethan und Ethanol bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde das Lösemittel destillativ entfernt, das erhaltene Rohprodukt chromatographisch gereinigt und das Produkt **65** mit einer Ausbeute von 99 % isoliert (s. Abbildung 4-20). Der nächste Schritt erfordert eine Reduktion der verbliebenen Azidgruppen, um die so entstehenden Amine im Folgenden mit Fmoc-Schutzgruppen versehen zu können. Die Reduktion der Azidgruppen von **65** erfolgte mit Pd/C und Ameisensäure in Ethanol bei 90 °C. Nach beendeter Reaktion wurde der Katalysator abfiltriert, das erhaltene Filtrat destillativ vom Lösemittel befreit und Produkt **66** in einer Ausbeute von 58 % isoliert (s. Abbildung 4-20). Eventuell besteht die Möglichkeit, die Ausbeute noch weiter zu verbessern, wenn die Reaktion unter verdünnten Bedingungen durchgeführt wird. In einer zu konzentrierten Reaktionslösung besteht das Risiko, dass die entstehenden Amine in einer nukleophilen Substitution noch vorhandene Azide substituieren und die Ausbeute sich aus diesem Grund verschlechtert (s. Kapitel 4.2.2, S. 86-88). Die anschließende Fmoc-Schützung erfolgte durch Rühren von **66**, Fmoc-Cl und Natriumhydrogencarbonat in Wasser/Dioxan (2/3) bei Raumtemperatur. Nach Extraktion mit Dichlormethan und destillativen Entfernen des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographisch gereinigt. Die Reinigung erfolgte auf einer RP18-Säule mit einem Methanol/Wasser-Gradient unter Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure. Beim destillativen Entfernen des Lösemittels der Produktfraktion wurde unter den leicht sauren Bedingung und der Erwärmung die freie Carbonsäure des Produkts **57** zum Methylester verestert. Um die Veresterung zu vermeiden wurde während der chromato-

graphischen Reinigung anstatt des Methanols Acetonitril verwendet. Produkt **57** konnte so mit einer Ausbeute von 43 % isoliert werden (s. Abbildung 4-20).

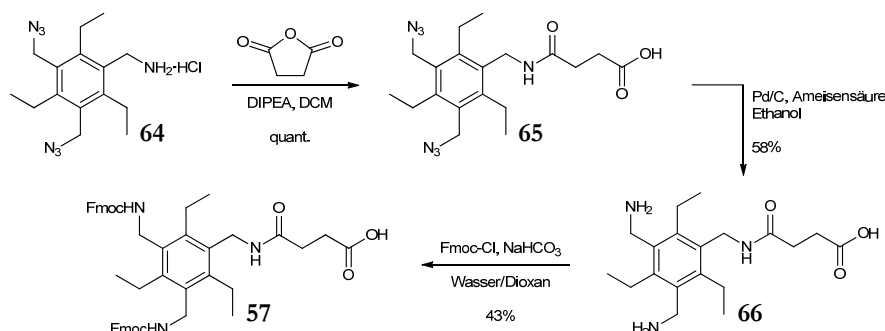


Abbildung 4-20: Detaillierter Syntheseweg von der monoreduzierten Verbindung **64** zum Baustein **57** für die Festphasensynthese.

Auf dem zweiten, im Rahmen der Doktorarbeit entwickelten und realisierten Syntheseweg konnte Baustein **57** in sechs Syntheseschritte ausgehend vom 1,3,5-Triethylbenzol (**59**) in einer Gesamtausbeute von 11 % synthetisiert werden. Die Gesamtausbeute des zweiten Syntheseweges ist mehr als doppelt so groß wie die des ersten Synthesewegs. Zusätzlich ist die Synthese weniger aufwendig, insbesondere da die Reinigung des dreifach geschützten Templates **60** wegfällt.

Um die Festphasensynthese weiter zu verbessern, wurden neben der Synthese für Baustein **57** auch ein neues Harz und neue Kupplungsbedingungen getestet. Rink-Amid-Harze sind die Standard-Festphasen für die Darstellung von primären Carboxamiden und auch Sulfonamiden mit Hilfe der Festphasensynthese. Nach dem Abspalten der direkt am Harz befindlichen Fmoc-Schutzgruppe - sollte eine vorhanden sein - kann das freie Amin mit Hilfe der Standard-Methoden zur Darstellung von Amidbindungen acyliert werden. Die resultierende, direkt an den Linker des Harzes geknüpfte Amidgruppe ist gegenüber einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen stabil, wird aber leicht durch die Behandlung mit 95 %iger Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten. Es gibt verschiedene Arten von Harzen mit unterschiedlichen Eigenschaften für die Festphasenpeptidsynthese. Bei dem in der Diplomarbeit verwendeten Harz ist der spaltbare Benzhydrylaminlinker direkt über eine Etherbindung an die Polystyrol-basierte Matrix gebunden. Neben den auf reinem Polystyrol basierenden Harzen gibt es auch Harze mit einer Polyethylenglycol-gepfropften Polystyrolmatrix (TentaGel) oder auch reine PEG-Matrizen (PEGA mit Polyacrylamid-Matrix, NovaPEG bzw. ChemMatrix (CM), (NovaPEG und CM sind unterschiedliche Namen verschiedener Hersteller für dasselbe Harz), s. Abbildung 4-21).¹³⁹

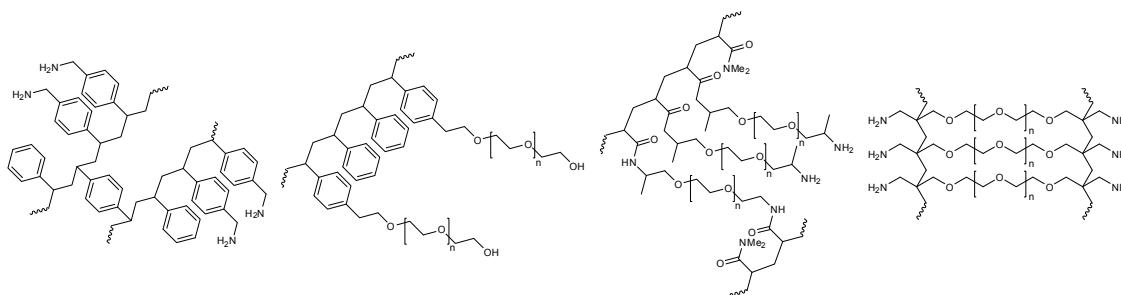


Abbildung 4-21: Strukturen verschiedener Harze für die Festphasensynthese. Von links nach rechts; Polystyrolharz; TentaGel: Harz auf Polyethylenglycol-gepfropfter Polystyrolbasis; PEGA: Harz auf Polyethylen-verknüpfter Polyacrylamidbasis; NovaPEG bzw. ChemMatrix: reine PEG-Harze (Der Name des Harzes ist abhängig vom Hersteller). Die abgebildeten Harze sind noch nicht mit spaltbaren Linkern versehen.¹³⁹

PEG kann drei unterschiedliche helikale Anordnungen einnehmen: eine sehr hydrophobe, eine mit mittleren hydrophoben Eigenschaften und eine hydrophile Anordnung. Durch diese einzigartige konformelle Flexibilität der PEG-Ketten sind diese Harze in der Lage, sich sowohl in unpolaren als polaren Lösemitteln gut zu lösen bzw. zu quellen (s. Abbildung 4-22). Ebenso ermöglichen polare Harze zusätzlich ein besseres Lösen der wachsenden Peptidkette.¹³⁹

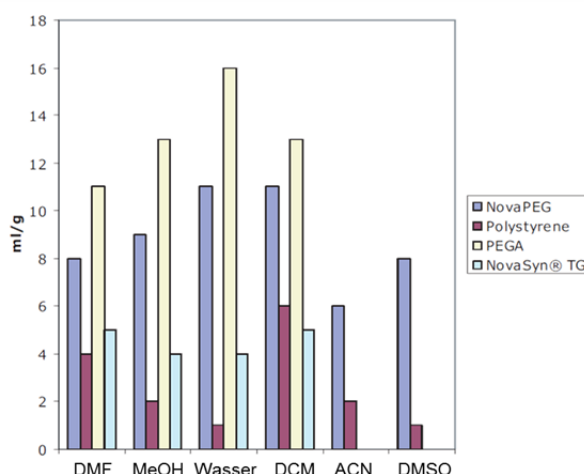


Abbildung 4-22: Vergleich der Löslichkeit bzw. der Quelleigenschaften verschiedener Harze (NovaPEG, Polystyrol, PEGA und NovaSyn TG (NovaSyn TG entspricht dem zuvor beschriebenen TentaGel)) in unterschiedlichen Lösemitteln. Reprinted with permission from Novabiochem, Peptide Synthesis Katalog, 2010/2011. Copyright Merck Merck KGaA.¹³⁹

Gewisse Peptidsequenzen, einschließlich sehr hydrophober oder verzweigter Strukturen, wie anscheinend auch der an der Festphase zu synthetisierende Rezeptor, sind äußerst schwierig zu synthetisieren.¹⁴⁰ Die beobachteten Probleme lassen sich auf die Aggregation der entstehenden Peptidketten, die schlechte Löslichkeit von Harzen als auch auf die mögliche Assoziation des Peptids mit dem Harz zurückführen. In der Literatur ermöglicht die Herstellung von synthetisch anspruchsvollen Peptiden (z. B. Polyarginin und β -Amyloid (1-42) (**67**)) den Vergleich von Polystyrol- und PEG-Harzen.¹⁴⁰ Das komplexe Polyarginin, aufgebaut aus 21 Aminosäuren, enthält drei aufeinander folgende Arginine am N-Terminus. Es ist bekannt, dass

Peptide, die Arginin enthalten, schwer zu synthetisieren sind, da die mit der Pbf-Schutzgruppe* geschützte Seitenkette des Arginins sterisch sehr anspruchsvoll ist. Mehr zum Tragen kommt jedoch die niedrige Ausbeute der Argininkupplung aufgrund der β -Lactam-Bildung. Das HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts zeigt, dass die Synthese am Fmoc-Rink-MBHA Harz† zwar das gewünschte Produkt liefert, aber nur in sehr geringen Ausbeuten und mit einer Vielzahl an Nebenprodukten (s. Abbildung 4-23 links). Das UV-Spektrum des HPLC-Laufs zeigt die Reinheit des Produkts in Abhängigkeit vom verwendeten Harz. Mittels Massenspektrometrie lässt sich die Abwesenheit von jeweils zwei oder drei Argininen am Ende der Peptidkette belegen. Die Synthese am Fmoc-Rink-CM Harz hingegen liefert das gewünschte Produkt in großer Ausbeute und es lassen sich keine Nebenprodukte mit den fehlenden Argininen finden (s. Abbildung 4-23).¹⁴⁰

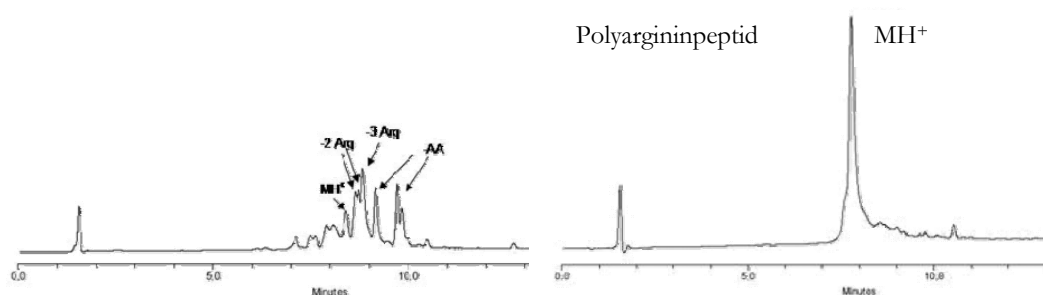


Abbildung 4-23: Links: HPLC-UV-Spektrum bei 220 nm des am Polystyrol-Harz synthetisierten Polyargininpeptids. **Rechts:** HPLC-UV-Spektrum bei 220 nm des am CM-Harz synthetisierten Polyargininpeptids.¹⁴⁰ Reprinted with permission from F. Garcia-Martin, M. Quintanar-Audelo, Y. Garcia-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 213-220. Copyright 2006 American Chemical Society.

Vergleichbare literaturbekannte Ergebnisse liefert die Synthese des β -Amyloid (1-42) (**67**) mit den beiden verschiedenen Harzen. β -Amyloid (1-42) (**67**) ist ein zur Aggregation neigendes Peptid und es wurden zahlreiche Syntheserversuche mit unterschiedlichsten Harzen, Bedingungen und Strategien unternommen, um die Schwierigkeiten der Synthese zu überwinden. Auch im Fall des β -Amyloid (1-42) (**67**) liefert der Einsatz des CM-Harzes hervorragende Ergebnisse in Bezug auf Reinheit und Ausbeute (s. Abbildung 4-24).¹⁴⁰

Im HPLC-UV-Spektrum des Rohprodukts ist nur ein einziger Hauptpeak mit einer Reinheit von 91 % zu sehen. Daraus kann gefolgert werden, dass allein durch den Einsatz von CM-Harz das Problem der Aggregation, welches bei der Nutzung unpolarer Harze auftritt, umgangen werden kann, ohne auf neue Methoden oder Synthesestrategien zurückgreifen zu müssen. Die amphiphile Natur der PEG Harze macht sie somit zu hervorragenden Materialien für die Synthese von schwierigen, verzweigten oder zur Aggregation neigenden Peptidstrukturen.

* Die Pbf-Schutzgruppe ist für Arginin die beste Wahl, da anderer mögliche Schutzgruppen (Mtr und Pmc) Entschützungszeiten von bis zu 12 Stunden benötigen und zur Reaktion mit sensiblen Resten des synthetisierten Peptids tendieren.¹³⁹

† Rink-MBHA Harz ist ein Polystyrol-basiertes Harz, das weniger säurelabil als Rink-Amid Harz ist. Der Benzhydrylamin-Linker ist über einen elektronenziehenden Acetamido-Abstandhalter mit dem Polymer verbunden.¹³⁹

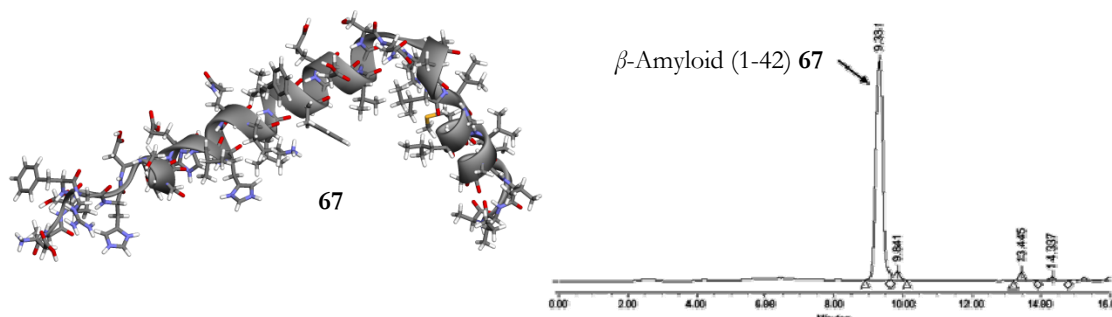


Abbildung 4-24: Röntgenkristallstruktur des β -Amyloid (1-42) (67) bestehend aus 42 Aminosäuren. HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von β -Amyloid (1-42) (67), welches am CM-Harz synthetisiert wurde.¹⁴⁰ Reprinted with permission from F. Garcia-Martin, M. Quintanar-Audelo, Y. Garcia-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 213-220. Copyright 2006 American Chemical Society.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Doktorarbeit für die Festphasensynthese des dreiarmligen Rezeptors das CM-Harz gewählt um Ausbeuteminderungen, die aufgrund von Aggregation und der Verzweigung des Moleküls zustande kommen könnten, zu verhindern.

Neben der Wahl eines neuen Harzes wurde zusätzlich auch nach effektiveren Kupplungsbedingungen und Methoden gesucht. Zu den Hauptschwierigkeiten, die bei der Festphasenpeptidsynthese auftreten, gehören unteranderen die Aspartatimidbildung, Racemisierung, die sterische Hinderung durch Schutzgruppen, β -Faltblattbildung und wie schon erwähnt die Aggregation der entstehenden Peptidkette. Diese Ursachen haben ein frühzeitiges Beenden der Peptidkette, Verunreinigungen und schlechte Ausbeuten zur Folge. Manche dieser Probleme lassen sich wie schon erwähnt durch die Wahl eines geeigneten Harzes umgehen. Eine seit einigen Jahren neue Möglichkeit zur optimierten Peptidsynthese ist der Einsatz von Mikrowellenenergie bei der Festphasensynthese. Der Einsatz der Mikrowellenenergie verspricht nicht nur im Falle der organischen Synthese¹⁴¹ sondern auch für die Festphasensynthese verminderte Nebenreaktionen, höhere Ausbeuten und Reinheiten und eine Verminderung der Reaktionsdauer. Wie schon erwähnt erfordern optimale Kupplungsbedingungen eine vollständig gelöste Peptid-Polymer Matrix, die einen effektiven Zugang der Kupplungsreagenzien ermöglicht. Während der Synthese von schwierigen Peptiden werden die Reaktionsstellen teilweise unzugänglich, typischerweise ab einer Länge von 4-15 Aminosäuren. Der Grund hierfür ist in der Aggregation der entstehenden Peptidketten mit sich selbst oder benachbarten Ketten aufgrund von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Peptidrücken zu suchen.^{142,143} Eine Hypothese warum Mikrowellenstrahlung einen positiven Einfluss auf die Festphasensynthese hat ist, dass die Strahlung zur Deaggregation des Peptidrückens führt und so die Reaktionsstellen der wachsenden Peptidkette wieder zugänglich werden (s. Abbildung 4-25).¹⁴⁴

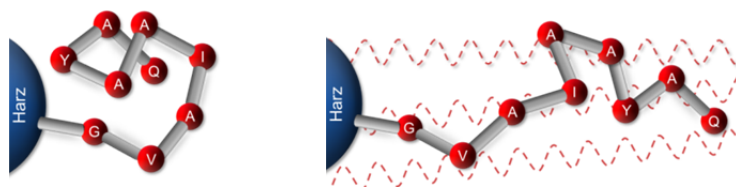
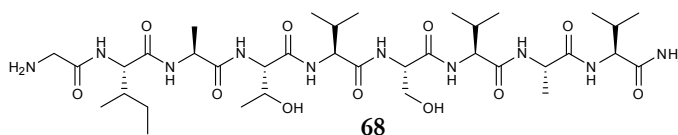


Abbildung 4-25: Schematische Illustration für ein Peptidrückgrat ohne (links) und mit (rechts) Mikrowelleneinstrahlung.¹⁴⁴

Der Vergleich von konventioneller Festphasenpeptidsynthese bei Raumtemperatur und Mikrowellen-unterstützter Festphasenpeptidsynthese zeigt, dass im Allgemeinen mit Hilfe der Mikrowellenstrahlung sowohl die Kupplungen als auch die Entschützungen wesentlich effektiver verlaufen und die synthetisierten Peptide eine höhere Reinheit in kürzeren Reaktionszeiten aufweisen (s. Tabelle 4-2).¹⁴⁵



Konventionelle Synthese bei Raumtemperatur

Nr.	Fmoc-Aminosäure		Kupplung		Entschützung		Reinheit [%]
	Äq.	Konzentration [mol·L ⁻¹]	Zeit [min]		Zeit [min]		
1	3	0.11	60		2 + 20		>1
2	5	0.18	60		2 + 20		32
3	10	0.36	60		2 + 20		37

Mikrowellen-unterstützte Synthese

Nr.	Fmoc-Aminosäure		Kupplung			Entschützung			Reinheit [%]
	Äq.	Konzentration [mol·L ⁻¹]	Zeit [min]	Power [W]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Power [W]	Temp. [°C]	
4	3	0.11	20	5	60	0.5 + 2.5	20	60	68
5	5	0.18	20	5	60	0.5 + 2.5	20	60	83
6	10	0.36	20	5	60	0.5 + 2.5	20	60	85
7	5	0.18	10	10	75	0.5 + 2.5	20	75	92

Tabelle 4-2: Synthese des Modellpeptids GILTVSVAV (**68**) am RAM-TentaGel Harz bei Raumtemperatur und mit Mikrowellenunterstützung.

Vergleichende Untersuchungen in der Literatur unter identischen Bedingungen bezüglich der Temperatur zeigen jedoch, dass bei der Gegenüberstellung von Erhitzen durch die Mikrowelle und konventionellem Erhitzen nur ein minimaler Unterschied bezüglich der Reinheit der synthetisierten Peptide durch Erhitzen mit Mikrowellenstrahlung erreicht wird. Dies lässt den Schluss zu, dass es so etwas wie einen nicht-thermischen, speziellen Mikrowelleneffekt nicht gibt, sondern die Mikrowelle im Falle der Festphasensynthese nur ein besonders effektives Erhitzen ermöglicht und aus diesem Grund bessere Ergebnisse erzielt als die konventionelle Synthese bei Raumtemperatur.¹⁴⁵ Dennoch stellt die Mikrowelle eine wesentlich praktikablere Möglichkeit zur Festphasensynthese unter Erhitzen dar.

In Tabelle 4-2 lassen sich entscheidende Kriterien für optimale Bedingungen für die Festphasensynthese in der Mikrowelle erkennen. So scheinen eine Mindestkonzentration der

Reaktionslösung von etwa $0.18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (s. Nr. 5 und 7) und möglichst hohe Reaktionstemperaturen (mind. $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$, s. Nr. 5 und 7) die besten Ergebnisse bezüglich der Reinheit des synthetisierten Peptids zu erzielen. Bei der Auswahl dieser Bedingungen, insbesondere der hohen Temperatur, ist zu berücksichtigen, dass im Testpeptid **68** keine Aminosäuren eingebaut sind, deren Kupplung problematisch ist und mit Nebenreaktionen verläuft wie z. B. im Fall von Histidin. Für die jeweilige Kupplung solcher Aminosäuren müssten entsprechend mildere Bedingungen gewählt werden.

Nach Auswahl des Harzes, der Entscheidung Mikrowellenenergie einzusetzen, die Auswahl der Bedingungen bezüglich Konzentration, Zeit und Temperatur wurde auch die Auswahl der Kupplungsreagenzien wohl bedacht. Bei der Suche nach den optimalen Kupplungsreagenzien wurde sowohl auf Effektivität als auch auf Stabilität geachtet. Da während der Mikrowellenunterstützten Festphasenpeptidsynthese erhitzt wird, sollte das Kupplungsreagenz auch unter diesen extremen Bedingungen stabil sein. In der Literatur wurden zehn verschiedene Kupplungsreagenzien an neun unterschiedlichen Modelsequenzen getestet.¹⁴⁶ DIC (Diisopropylcarbodiimid, **69**) erwies sich als das optimale Reagenz für den Fall, dass die Geschwindigkeit der Reaktion nicht entscheidend ist. Bei der Reaktion mit DIC kann allerdings das Carbodiimid-Addukt zum *N*-Acylharnstoffderivat umlagern, bevor der nukleophile Angriff des Amins erfolgt ist. Um dies zu verhindern, kann HOBt bzw. auch das reaktivere 6-Cl-HOBt (**70**) zugegeben werden (s. Abbildung 4-26).

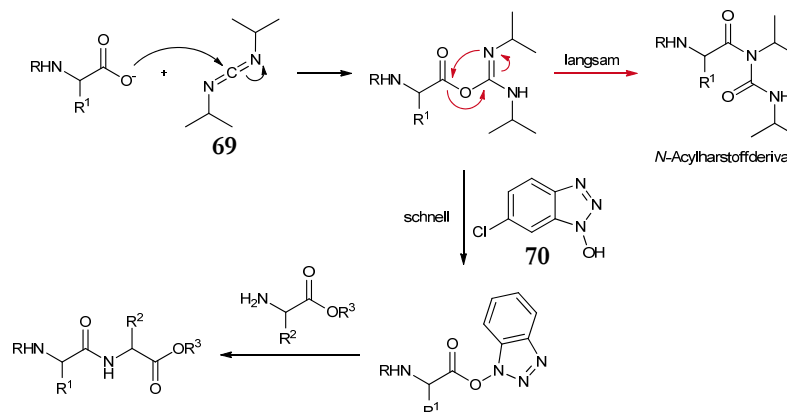


Abbildung 4-26: Amidbildung mit Carbodiimid. Durch den Einsatz von HOBt bzw. 6-Cl-HOBt wird die Bildung des unreaktiven *N*-Acylharnstoffderivats verhindert.

Aufgrund der allgemeinen guten Kupplungseigenschaften und der hohen Stabilität von DIC/Cl-HOBt wurde insbesondere im Hinblick auf die Durchführung der Peptidkupplungen unter hohen Temperaturen dieses Kupplungssystem für die Rezeptorsynthese an der Festphase ausgewählt.¹⁴⁶ Als Lösemittel für die Kupplungsreaktion wurde DMF mit einem Zusatz von 20 % NMP gewählt. DMF ist das traditionelle Lösemittel für Kupplungsreaktionen, da sich in der Regel alle erforderlichen Reagenzien gut in DMF lösen. NMP besitzt eine hohe thermische

Stabilität und trägt zusätzlich zur Verhinderung der Aggregation während der Peptidsynthese bei.^{147,148}

Mit den ausgewählten Kupplungsbedingungen, den Kupplungsreagenzien und einem neuen Harz wurde die Synthese des Rezeptors **71** mit Hilfe der Mikrowelle durchgeführt (s. Abbildung 4-27). Für Rezeptor **71** wurden als Aminosäuren *L*-Tyrosin, *L*-Serin, *L*-Lysin und *L*-Glycin versehen mit den entsprechenden Schutzgruppen ausgewählt. Alle Aminosäuren lassen sich ohne Nebenreaktionen und in guten Ausbeuten kuppeln.^{129,149} Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit zur Ausbildung nicht-kovalenter Wechselwirkungen und damit der Nachahmung natürlicher Bindungsstellen und dienen der Löslichkeit des Rezeptors in reinem Wasser.

Die Festphasenpeptidsynthese wurde in einem Mikrowellenbeschleunigtem Laborsystem Discover SPS für die schnelle Peptidsynthese der Firma CEM durchgeführt (s. Abbildung 4-27).¹⁵⁰

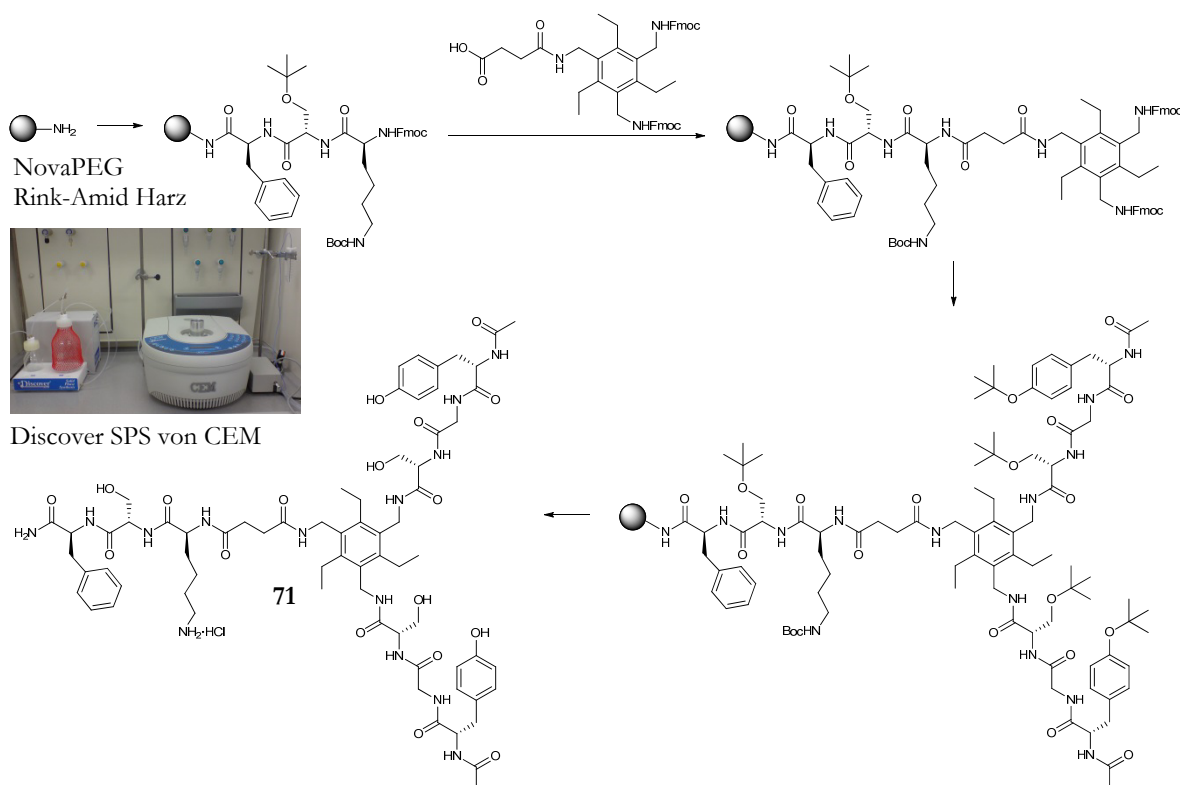


Abbildung 4-27: Schema der Festphasenpeptidsynthese des Rezeptors **71**.

NovaPEG Rink-Amid Harz (Beladung: 0.45 mmol·g⁻¹) wurde in 6 ml Dimethylformamid/Dichlormethan (1/1) für 1.5 Stunden gequollen. Die Kupplung aller Aminosäuren bzw. Bausteine erfolgte in einer mindestens 0.18 molaren Lösung unter Mikrowellenbedingungen. Die erste Kupplung von Fmoc-Phe-OH (0.27 mmol, 3.00 Äq.) wurde zweimal durchgeführt mit DIC (0.27 mmol, 3.00 Äq) und Cl-HOBt (0.27 mmol, 3.00 Äq.) in 1.5 ml

Dimethylformamid mit 20 % NMP für 20 min bei 20 W und 96 °C. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen. Nach erfolgtem negativem *Kaisertest*¹³³ wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie folgt abgespalten. Das Harz wurde zweimal mit je 2 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in Dimethylformamid versetzt und einmal für 30 s bei 20 W und 75 °C erhitzt und ein zweites Mal mit frischer Abspalllösung für 3.5 min unter denselben Bedingungen erhitzt. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen und nach erfolgtem positivem *Kaisertest*¹³³ mit der nächsten Kupplung unter den Bedingungen wie schon beschrieben fortgefahren. Die folgenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (0.27 mmol, 3.00 Äq), Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.27 mmol, 3.00 Äq.) und Baustein **57** (0.27 mmol, 3.00 Äq.) wurden jeweils nur einmal durchgeführt während die anschließenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (0.54 mmol, 6.00 Äq.), Fmoc-Gly-OH (0.54 mmol, 6.00 Äq.) und Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (0.54 mmol, 6.00 Äq.) zweimal durchgeführt wurden, um aufgrund der Verzweigung des Peptids die Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Reaktion aller Amine zu erhöhen. Bei jeder Kupplung betrug die Konzentration der Reaktionslösung 0.27 mmol bezogen auf die entsprechende Aminosäure und enthielt DIC (0.27 mmol, 3.00 Äq. bzw. 0.54 mmol, 6.00 Äq.) und Cl-HOBt (0.27 mmol, 3.00 Äq. bzw. 0.54 mmol, 6.00 Äq.). Nach Kupplung des Bausteins **57** wurden insgesamt sechs Äquivalente der entsprechenden Reagenzien eingesetzt, was pro zu synthetisierenden Arm drei Äquivalenten entspricht. Während der Kupplung der letzten Aminosäure Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH quoll das Harz so stark, dass nur noch wenig Lösemittel vorhanden war. Daher wurde bei Wiederholung des Kupplungsschritts die Menge des Lösemittels bei gleichbleibender Konzentration der Aminosäure verdoppelt. Jeder Kupplungsschritt wurde mittels des *Kaisertests*¹³³ überprüft. Nach der letzten erfolgreichen Kupplung folgte ein Acetylierungsschritt mit Essigsäureanhydrid (5.00 Äq.) und DIPEA (10.0 Äq.) in Dichlormethan/Dimethylformamid (7/3). Durch den Acetylierungsschritt können die ansonsten freien Amine in späteren Bindungsstudien nicht mehr protoniert werden. Somit ahmen die Enden der Rezeptorarme besser den tendenziell unpolaren Eingang natürlich vorkommender Bindungsstellen nach. Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten wurde, wurde das Harz sorgfältig gewaschen. Das Harz wurde zunächst dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml), anschließend dreimal mit Methanol (je 10 ml), zweimal mit Diethylether (je 10 ml) und zum Abschluss noch dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz zweimal mit je 20 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser für je 1.5 Stunden abgespalten.¹³⁹ Anschließend wurde das Harz nochmals mit 10 ml der Abspalllösung gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Ölpumpenvakuum auf ca. 2 ml

eingengt und mit 50 ml frisch destilliertem Diethylether versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert, gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das in einer Ausbeute von 44 % (61 mg) erhaltene Rohprodukt wurde zunächst chromatographisch und massenspektrometrisch auf das gewünschte Produkt und dessen Reinheit hin untersucht. Wie in Abbildung 4-28 zu erkennen ist, zeigt das Massenspektrum des Rohprodukts, dass sowohl das gewünschte Produkt als auch einige Nebenprodukte gebildet wurden.

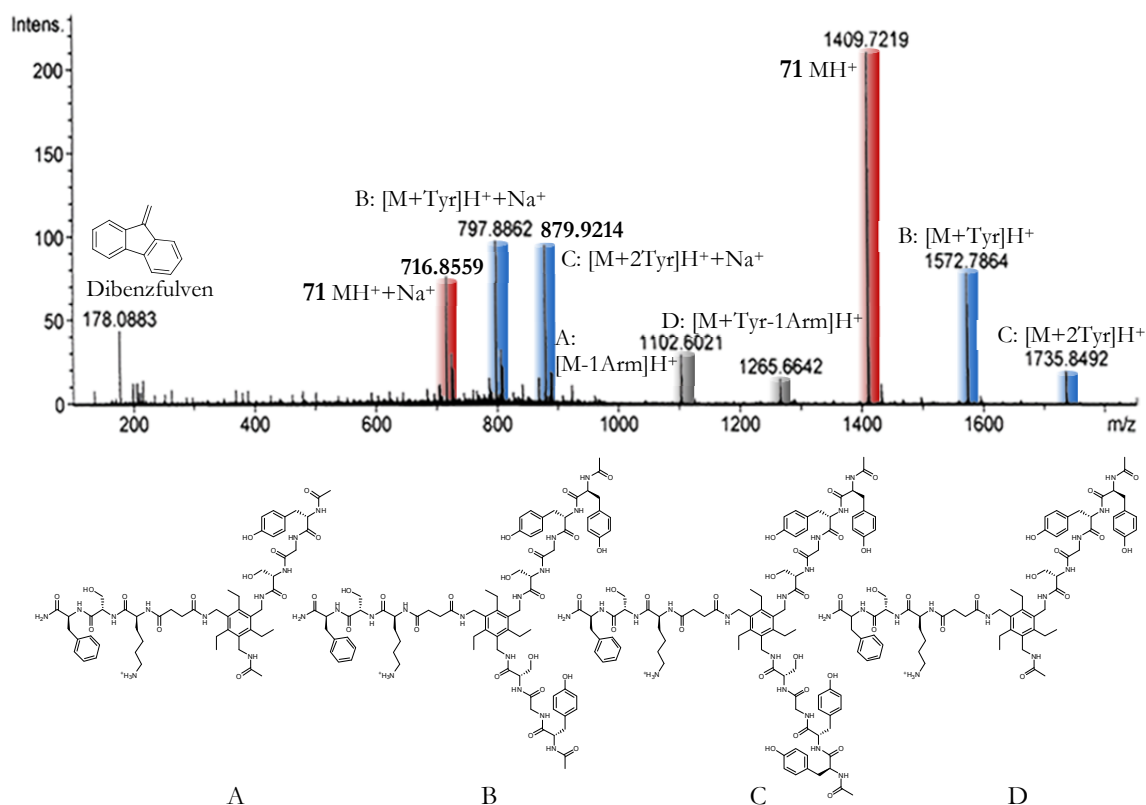


Abbildung 4-28: Massenspektrum des Rohprodukts der Mikrowellen-unterstützten Festphasensynthese des Rezeptors **71**. Laut Massenspektrum sind im Rohprodukt der gewünschte Rezeptor **71** (rot), Nebenprodukte mit einem oder zwei Tyrosinen zu viel (blau) und Nebenprodukte, denen einer der identischen Arme fehlt in Kombination mit einem Tyrosin zu viel (grau), enthalten.

Es fällt auf, dass fast alle in der Masse identifizierten Nebenprodukte ein oder zwei Tyrosine zu viel haben und dass teilweise bei der Kupplung der beiden identischen Arme anstelle von zwei Armen nur ein Arm aufgebaut wurde. Die Ursache für den Aufbau nur eines Armes könnte sowohl in nicht vollständig unterbundener Aggregation oder in sterischer Hinderung begründet sein als auch daran liegen, dass die Kupplung der ersten Aminosäure an die freien Amine des Bausteins **57** schwieriger als die anderen Kupplungen ist.

Betrachtet man das HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts so sind drei Hauptpeaks zu erkennen (s. Abbildung 4-29).

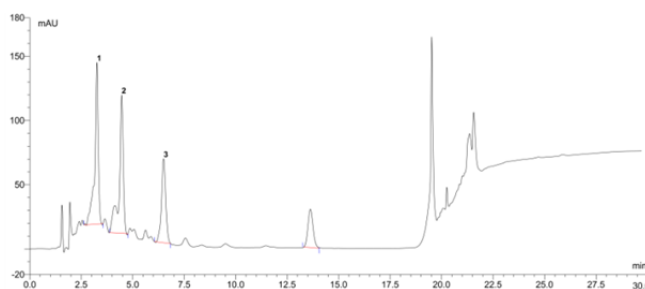


Abbildung 4-29: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts der Mikrowellen-unterstützten Festphasensynthese des Rezeptors **71**. Säule: RP18-Material, 150 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm; Laufbedingungen: isokratisch über 15 min 23 % Acetonitril (0.05 % TFA-Zusatz) 77 % Wasser (0.05 % TFA-Zusatz), in einer Minute auf 100 % Acetonitril; Flussrate: 0.5 ml·min⁻¹; Detektion bei 220 nm; Peak 1 = **71**.

Die massenspektrometrische Untersuchung der einzelnen Hauptpeaks ergibt, dass das gewünscht Produkt **71** in Peak 1 enthalten ist, zusätzlich mit dem Nebenprodukt, dem ein Arm fehlt. Im Massenspektrum des zweiten Peaks konnte der Rezeptor mit einem zusätzlichen Tyrosin und im Massenspektrum des dritten Peaks der Rezeptor mit zwei zusätzlichen Tyrosinen gefunden werden. Die Ursache für die Mehrfachkupplung des Tyrosins liegt vermutlich am ungewöhnlich starken Quellen des Harzes während des Kupplungsschritts von Fmoc-Tyr(β Bu)-OH. Aufgrund des starken Quellens des Harzes verringert sich die Lösemittelmenge und die Temperaturmessung während der Reaktion mittels des in die Lösung eintauchenden Temperaturfühlers kann nicht mehr adäquat erfolgen. Dadurch steigt die Temperatur zu stark an und die Fmoc-Schutzgruppen werden teilweise abgespalten. Bei der Wiederholung des Kupplungsschritts kann es somit zu Mehrfachkupplungen kommen.

Um das Rohprodukt zu reinigen und das gewünscht Produkt zu isolieren, wurden zunächst Laufbedingungen gesucht, die eine optimale Trennung zunächst mittels MPLC und später mit Hilfe einer semipräparativen HPLC ermöglichen. Abbildung 4-30 zeigt die verschiedenen Läufe, deren Bedingungen für die Trennung an der MPLC geeignet sein könnten.

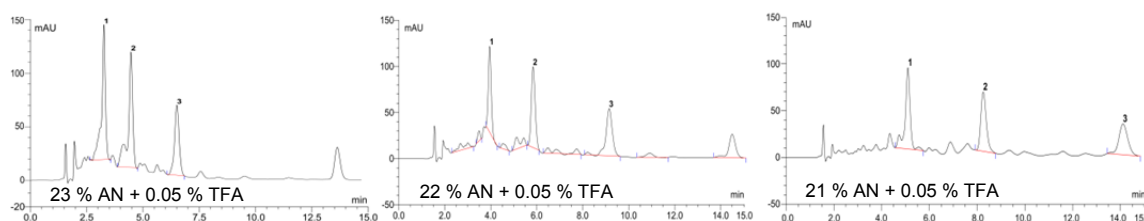


Abbildung 4-30: Verschiedene HPLC-Läufe zur Ermittlung der optimalen Laufbedingungen zur Reinigung des Rohprodukts. Säule: RP18-Material, 150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm; Laufbedingungen: isokratisch über 15 min 23 %, 22 % und 21 % Acetonitril (0.05 % TFA-Zusatz) 77 %, 78 % und 79 % Wasser (0.05 % TFA-Zusatz); Flussrate: 0.5 ml·min⁻¹; Detektion bei 220 nm.

Im ersten Versuch wurde das Rohprodukt an der MPLC über RP18 Material (5 μ m, 15 nm) mit 23 % Acetonitril und 77 % Wasser mit einem Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure gesäult. Bei der Trennung und Reinigung von Peptiden bzw. peptidischen Strukturen mit RP-Säulen bleibt im Allgemeinen das Peptid am Anfang der Säule adsorbiert bis die Konzentration der

mobilen Phase die kritische Konzentration erreicht, die die Desorption des Peptids bewirkt. Das Peptid desorbiert und wird, kaum mit der stationären Phase wechselwirkend, eluiert.^{151,152} Wie in Abbildung 4-30 zu erkennen ändert sich das Elutionsverhalten des Produkts und der Nebenprodukte merklich sobald die Lösemittelzusammensetzung nur um ein Prozent variiert. Daher wurden die Lösemittel für die chromatographische Reinigung an der MPLC abgewogen und vorgemischt, um die exakten Lösemittelverhältnisse zu erhalten. Wie in Abbildung 4-31 zu sehen wurde jedoch bei der Verwendung eines 21 % Acetonitrilanteils innerhalb von 30 min kein Peak eluiert. Daher wurde der Acetonitrilanteil des Laufmittelgemischs auf 23 % erhöht. Diese Änderung führte jedoch zu einer sofortigen Elution der kompletten Probe.

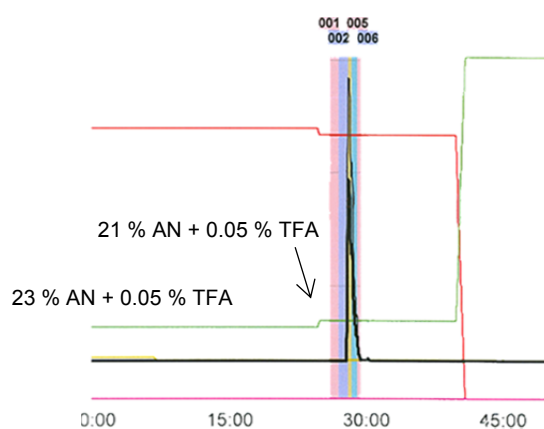


Abbildung 4-31: Chromatogramm des ersten Reinigungsversuchs des Rohprodukts der Festphasensynthese an der MPLC. Laufbedingungen: isokratisch Acetonitril/Wasser 0.05 % TFA-Zusatz; Flussrate: 30 ml·min⁻¹; Säule: 40 g RP18-Material YMC GEL ODS-A 12 nm, S-15 µm.

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde in einem zweiten Anlauf das Rohprodukt per MPLC mit einem Acetonitrilanteil von 22 % über RP18 Material gereinigt. Wie in Abbildung 4-32 zu sehen konnten drei Hauptfraktionen isoliert werden.

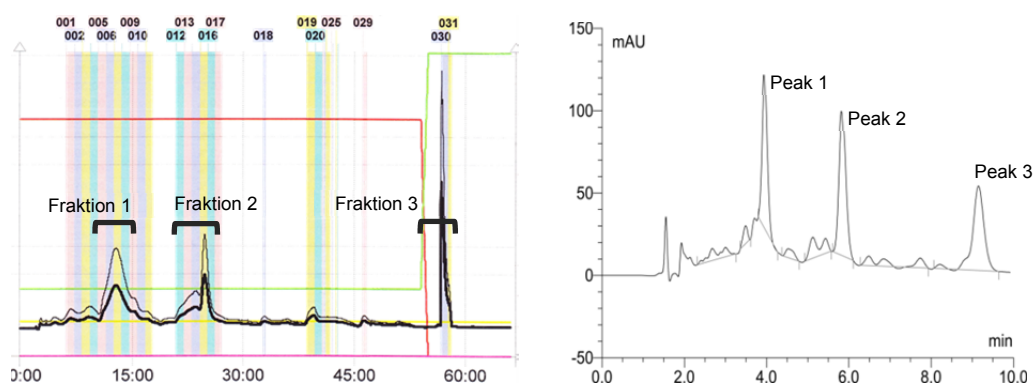


Abbildung 4-32: Chromatogramm des zweiten Reinigungsversuchs des Rohprodukts der Festphasensynthese an der MPLC mit im Vergleich mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts. Laufbedingungen: isokratisch 22 % Acetonitril, 0.05 % TFA-Zusatz; Flussrate: 30 ml·min⁻¹; Säule: 40 g RP18-Material YMC GEL ODS-A 12 nm, S-15 µm. Fraktion 1 bzw. Peak 1: 5 mg (M, M-1Arm), Fraktion 2 bzw. Peak 2: 11 mg (M-Tyr), Fraktion 3 bzw. Peak 3: 9 mg (M+2Tyr).

Eine massenspektrometrische Untersuchung der einzelnen Fraktionen zeigte, dass die Fraktionen 1-3 den Peaks 1-3 des HPLC-Chromatogramms zugeordnet werden können. Fraktion 1 enthielt somit das gewünschte Produkt, mit einer Reinheit von etwa 80 % im Vergleich zu 15 % Reinheit vor der chromatographischen Reinigung per MPLC. In einem weiteren Reinigungsschritt wurden die erhaltenen 5 mg der Fraktion 1 nochmal über eine semipräparative HPLC-Säule gereinigt und anschließend unter Zugabe von Salzsäure zum Chloridsalz umgesalzen (s. Abbildung 4-33).

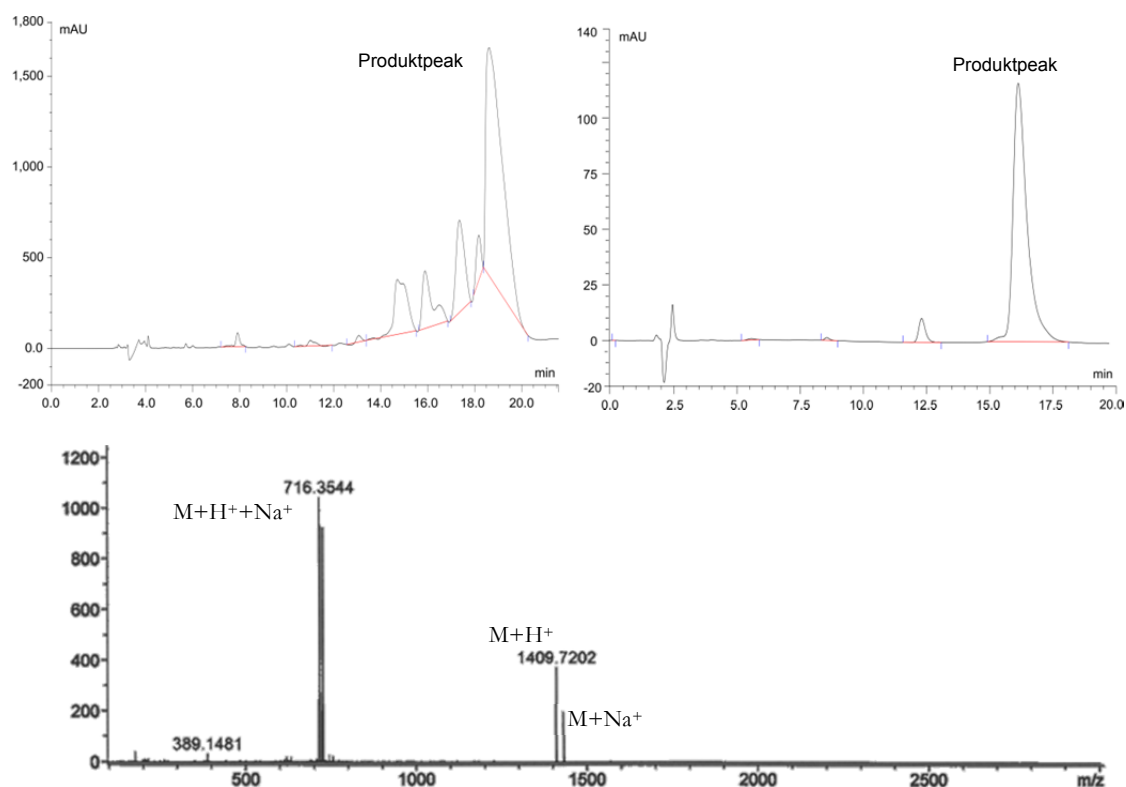


Abbildung 4-33: Chromatogramm des letzten Reinigungsschritts des Rohprodukts mit einer semipräparativen HPLC-Säule (RP-18 Säule: 150 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm, Laufbedingungen: 18.5 % Acetonitril mit 0.05 % TFA-Zusatz, 81.5 % Wasser mit 0.05 % TFA-Zusatz, Flussrate: 5.5 ml \cdot min $^{-1}$, Wellenlänge: 220 nm). Chromatogramm des reinen Produkts (RP-18 Säule: 150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm, Laufbedingungen: 18.5 % Acetonitril mit 0.05 % TFA-Zusatz, 81.5 % Wasser mit 0.05 % TFA-Zusatz, Flussrate: 0.5 ml \cdot min $^{-1}$, Wellenlänge: 220 nm). Die Ausbeute beträgt 2 % mit einer Reinheit von 95 %.

Nach diesem letzten Reinigungsschritt konnte der gewünschte Rezeptor **71** unter Berücksichtigung der realen Beladung des Harzes in einer Ausbeute von 2 % (2 mg) und einer Reinheit von 95 % isoliert werden (s. Abbildung 4-33). Die gewählten Bedingungen bezüglich des Harzes, der Kupplungsreagenzien und der Mikrowellenunterstützung haben die Synthese des Rezeptors **71** ermöglicht. Allerdings war die Reinheit des Rohprodukts mit nur 15 % nicht zufriedenstellend und in diesem Zusammenhang litt auch aufgrund der aufwändigen Reinigung die endgültige Ausbeute (2 %). Aus diesem Grund wurde in weiteren Festphasensynthesen versucht, die entscheidenden Kupplungsstellen zu finden, die für die moderate Reinheit und geringe Ausbeute verantwortlich sind. Betrachtet man die Struktur der Nebenprodukte liegt die

Vermutung nahe, dass die Kupplung des Serin und des Tyrosins die kritischen Kupplungsschritte sind. Daher wurden die in Abbildung 4-34 gezeigten Teilrezeptoren **72**, **73** und nochmals der vollständigen Rezeptor **71** unter optimierten Bedingungen an der Festphase synthetisiert. Rezeptor **72** wurde synthetisiert, um sicherheitshalber die Qualität der Kupplung des künstlichen Bausteins **57** zu überprüfen.

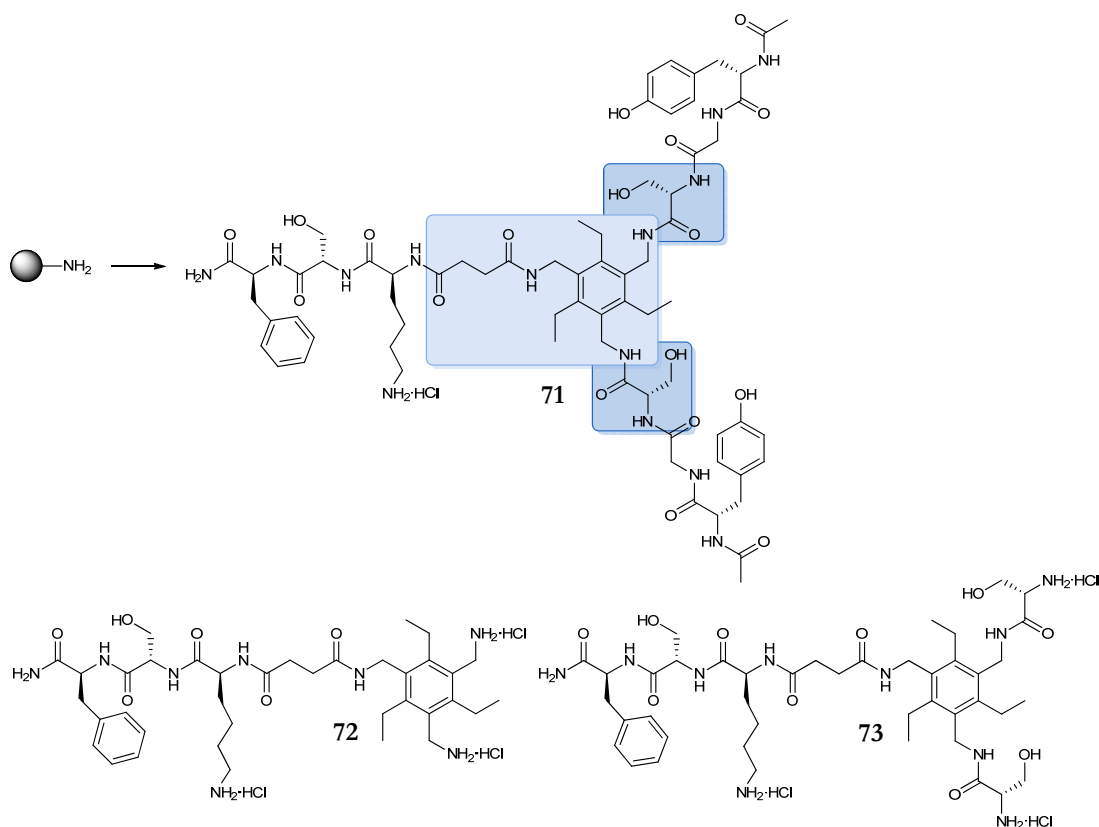


Abbildung 4-34: Strukturen der Rezeptoren **71**, **72** und **73**. Die möglichen kritischen Kupplungsschritte des Bausteins **57** und des darauffolgenden Serins sind farblich gekennzeichnet.

Unter den gleichen Bedingungen wie die zuvor beschriebene erste Synthese des Rezeptors **71** wurden die Rezeptoren **72** und **73** sowie nochmals Rezeptor **71** synthetisiert. Einzig die Lösemittelmenge bei der Kupplung der Aminosäure Tyrosin wurde bei gleichbleibender Konzentration verdoppelt, um der Verminderung des Lösemittels durch Aufquellen des Harzes entgegen zu wirken. In den folgenden Abbildungen sind die Reinheiten und Ausbeuten der Rohprodukte und der gereinigten Produkte der Synthesen der Rezeptoren **72**, **73** und **71** dargestellt. Die Kupplung des künstlichen Bausteins **57** und der darauffolgende Aminosäure Serin verlief vielversprechend ohne einen Hinweis darauf, dass einer dieser Kupplungsschritte für die moderate Ausbeute der Synthese des Rezeptors **71** verantwortlich ist. Das Rohprodukt des Teilrezeptors **72** wurde in einer Ausbeute von 50 % und einer Reinheit von 71 % isoliert und konnte nach anschließender chromatographischer Reinigung mittels präparativer HPLC in einer Reinheit von 96 % und Ausbeute von 39 % (22 mg) isoliert werden.

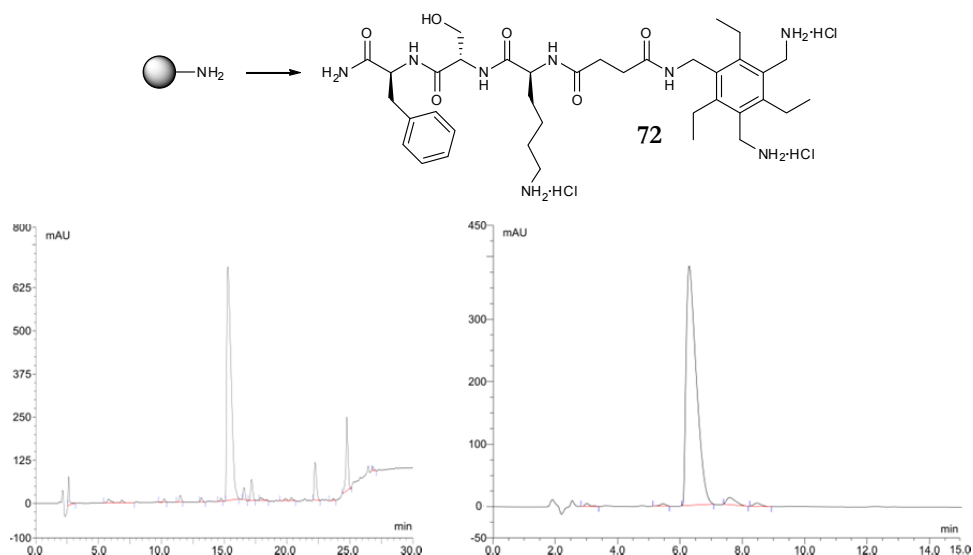


Abbildung 4-35: Teilrezeptor **72** und die HPLC-Chromatogramme des Rohprodukts und des reinen Produkts. Die Ausbeute des Rohprodukts betrug 50 % (36 mg) und die Reinheit 71 %. Die Ausbeute des reinen Produkts betrug 39 % (22 mg) und die Reinheit 96 %. RP-18 Säule: 150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm; Flussrate: 0.43 ml·min⁻¹; Wellenlänge: 220 nm. Laufbedingungen Rohprodukt: Gradient über 20 min von 10 % auf 20 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz, 21-30 min 100 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz. Laufbedingungen gereinigtes Produkt: isokratisch über 15 min 14 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz.

Ebenso konnte das Rohprodukt des Teilrezeptors **73** mit einer Ausbeute von 56 % und in einer sehr guten Reinheit - für eine Festphasenpeptidsynthese - von 88 % isoliert werden. Die anschließende chromatographische Reinigung ergab **73** in einer Reinheit von 93 % (16 mg) (s. Abbildung 4-36).

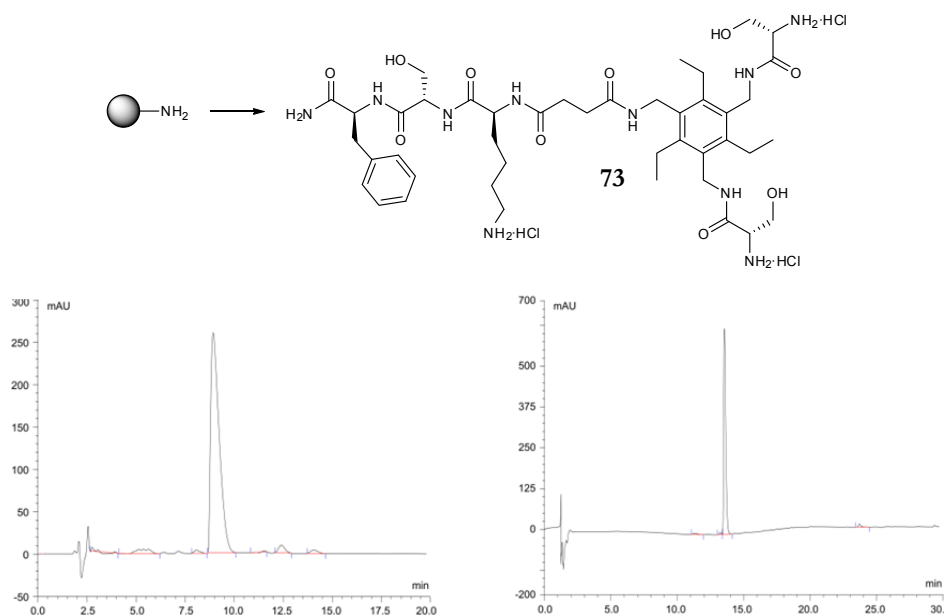


Abbildung 4-36: Teilrezeptor **73** und die HPLC-Chromatogramme des Rohprodukts und des reinen Produkts. Die Ausbeute des Rohprodukts betrug 56 % (47 mg) und die Reinheit 88 %. Die Ausbeute des reinen Produkts betrug 24 % (16 mg) und die Reinheit 93 %. RP-18 Säule: 150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm; Flussrate: 0.43 ml·min⁻¹; Wellenlänge: 220 nm. Laufbedingungen Rohprodukt: isokratisch über 20 min 14 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz. Laufbedingungen gereinigtes Produkt: Gradient über 30 min 10 % Methanol bis 100 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz.

Die Ausbeute des gereinigten Produkts **73** betrug trotz der relativ guten Ausbeute des Rohprodukts von 56 % nur 24 % (16 mg) in Bezug auf die reale Beladung des Harzes. Dies ließ sich jedoch auf praktische Probleme bei der Reinigung und dadurch verursachten Produktverlust zurückführen. Betrachtet man die Ausbeute des Rohprodukts von 56 % und die Reinheit von 88 % und vergleicht diese mit der Ausbeute (50 %) und Reinheit (71 %) des Rohprodukts des Teilrezeptors **72** lässt dies den Schluss zu, dass auch die Kupplung der Aminosäure Serin nicht für die moderate Gesamtausbeute des Rezeptors **71** verantwortlich ist. Wie schon erwähnt kam es während der Synthese des Rezeptors **71** bei der Kupplung des Tyrosins zu einer unerwartet hohen Volumenzunahme des Harzes, was zu einer extremen Verminderung des Lösemittels führte. Um dies zu verhindern und zu überprüfen, ob die durch außergewöhnliche Quellung des Harzes verursachte Lösemittelabnahme für die vielen Nebenprodukte verantwortlich ist, wurde bei der zweiten Synthese des Rezeptors **71** das Volumen des Lösemittels während der Kupplung des Tyrosins verdoppelt, ohne die Konzentration der Reagenzien zu verändern. Wie sich im Vergleich der Reinheiten der Rohprodukte (15 % erste Synthese und 81 % zweite Synthese) der beiden Synthesen des Rezeptors **71** zeigt, konnte durch die Veränderung der Lösemittelmenge während der Kupplung der Aminosäure Tyrosin, sowohl die Reinheit als auch die Ausbeute des Rohprodukts von 44 % auf 56 % deutlich verbessert werden. Die chromatographische Reinigung des Rohprodukts der ersten Synthese konnte aufgrund der geringen Menge von 5.00 mg mit Hilfe einer semipräparativen Säule durchgeführt werden. Die Reinigung des Rohprodukts der zweiten Synthese wurde aufgrund der größeren Menge des Rohprodukts (110 mg) an einer präparativen HPLC-Anlage durchgeführt. Beim destillativen Entfernen des Lösemittels der Produktfraktion, kam es jedoch aufgrund der Lösemittelmenge und der dadurch verursachten Dauer und Temperatur der Destillation vermutlich zur Zersetzung des Produkts. Das HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts zeigt eine Reinheit von 81 % während das Chromatogramm des gereinigten Produkts eine verschlechterte Reinheit von 49 % zeigt (s. Abbildung 4-37). Daher wurde anschließend eine weitere Reinigung vorgenommen und die Entfernung des Lösemittels unter milderer Bedingungen im Ölpumpenvakuum ohne Erwärmung und mittels Lyophilisation durchgeführt. So konnte Rezeptor **71** schließlich in einer Reinheit von 96 % und einer Ausbeute von 10 % (16 mg) erhalten werden (s. Abbildung 4-37). Die Ausbeute wäre deutlich besser ausgefallen, wenn nicht im ersten Reinigungsversuch bei der destillativen Entfernung des Lösemittels das Produkt teilweise zersetzt worden wäre.

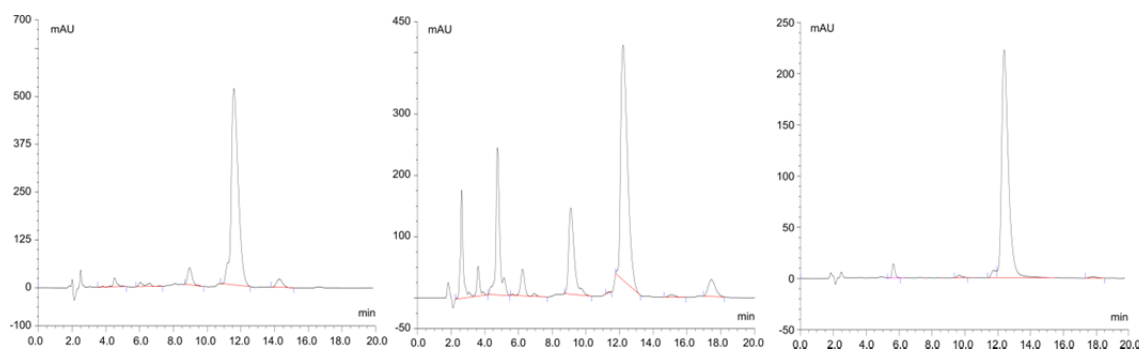


Abbildung 4-37: HPLC-Chromatogramme des Rohprodukts, des Produkts des ersten Reinigungsversuchs und des reinen Produkts **71**. Die Ausbeute des Rohprodukts betrug 56 % (110 mg) und die Reinheit 81 %. Die Reinheit nach dem ersten Reinigungsversuch verschlechterte sich auf 49 %. Die Ausbeute des reinen Produkts betrug 10 % (16 mg) mit einer Reinheit von 96 %. RP-18 Säule: 150 mm Länge, 3 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm. Laufbedingungen Rohprodukt: isokratisch über 20 min 20 % Acetonitril mit 0.05 % TFA-Zusatz, Flussrate: 0.43 ml \cdot min $^{-1}$, Wellenlänge: 220 nm.

Die Bedingungen für die Festphasensynthese des Rezeptors **71** konnten durch die Wahl des Harzes, der Kupplungs- und Synthesebedingungen soweit optimiert werden, dass der gewünschte Rezeptor in guten Reinheiten und Ausbeuten synthetisiert werden kann. Entscheidend für das Gelingen der Synthese waren die Verwendung des Polyethylen-basierten Harzes (NovaPEG), der Einsatz der Mikrowellentechnik (96 °C, 20 W, 20 min) und die Verwendung der Kupplungsreagenzien DIC und Cl-HOBt. Wobei bei der Kupplung der jeweiligen Aminosäuren bzw. Bausteine nicht die Anzahl der Äquivalente allein entscheidend ist sondern die Konzentration der Reagenzien, die mindestens 0.18 mol \cdot L $^{-1}$ pro freiem Amin betrug. Ein weiterer entscheidender Punkt war die Erhöhung des Volumens der Reaktionslösung bei gleichbleibender Konzentration während der Kupplung des Tyrosins. Die Erhöhung des Lösemittelvolumens verhindert die Lösemittelverminderung aufgrund des ungewöhnlich starken Quellens des Harzes. Der letzte zum Erfolg der Synthese beitragende Faktor ist die Entfernung des Lösemittels nach der chromatographischen Reinigung unter milden Bedingungen. Somit konnte schließlich die entwickelte Synthesestrategie an der Festphase, trotz des Schwierigkeitsgrades der Synthese aufgrund der verzweigten Struktur und dem möglichen Aggregationsverhalten, erfolgreich optimiert, synthetisch umgesetzt und der potentielle Rezeptor **71** synthetisiert werden.

4.2.2 Synthesen in Lösung

Neben der Synthese an der Festphase wurden auch symmetrische und unsymmetrische Rezeptoren in Lösung synthetisiert. Abbildung 4-38 zeigt nochmals die bereits vorgestellte Strategie zur Synthese symmetrischer Rezeptoren in Lösung. Ausgangspunkt der Synthese ist Templat **55**.

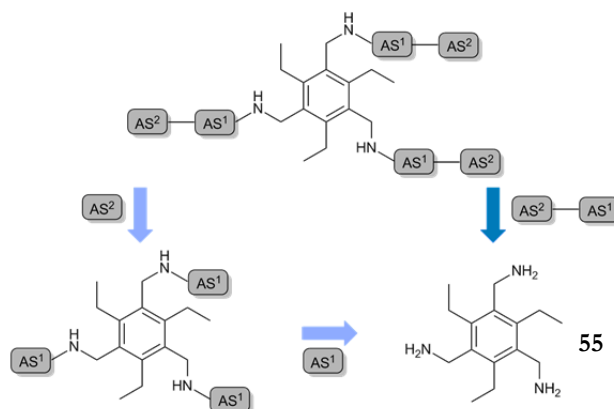


Abbildung 4-38: Schematische Illustration der in Lösung synthetisierten Rezeptoren. Die Rezeptorarme sind aus je zwei Aminosäuren aufgebaut. Ausgangsmolekül für die Synthese ist Templat **55**.

Triamin **55** wurde zuvor nach literaturbekannter Synthese über zwei Stufen in einer Ausbeute von 48 % ausgehend von Tribromid **61** über Triphthalid **62** synthetisiert (s. Abbildung 4-14). Im Rahmen der neu entwickelten optimierten Synthese für Baustein **57** für die Festphasensynthese wurde Tribromid **61** durch nukleophile Substitution mit Natriumazid zum Triazid **63** umgesetzt. Azide lassen sich durch Reduktion zu Aminen umsetzen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedenen Bedingungen zur Reduktion des Triazids zum Triamin getestet (s. Tabelle 4-3).

Nr.	Bedingungen	Ergebnis
1	Mg, Jod (kat.), MeOH	Kein Produkt
2	Mg (Pulver), Jod (kat.), THF, ΔT	Edukt, wenig Produkt
3	Mg, Jod (kat.), MeOH, ΔT	Edukt/Produkt 1/1
4	LiAlH_4 , THF	Kein Edukt, kein Produkt
5	NaBH_4 , THF, ΔT	Edukt, wenig Produkt
6	Zn, HCl, MeOH	kein Produkt
7	Exp. mit H_2 , Pd/C, (höhere Konz. als bei Nr.9)	Verunreinigungen, Ausbeute: etwa 50 % oder weniger
8	H_2 , Pd/C + TFA-Zugabe	Verunreinigungen, längere Reaktionszeit notwendig
9	H_2 , Pd/C, verdünnt	Ausbeute: quantitativ

Tabelle 4-3: Auflistung der verschiedenen Bedingungen zur Reduktion des Triazids **63** zum Triamin **55** und die jeweiligen Ergebnisse.

Um Triazid **63** zum Triamin **55** zu reduzieren, wurden folgende Bedingungen und Reagenzien getestet: Mg, Jod (kat.), MeOH (Nr. 1),¹⁵³ Mg (Pulver), Jod (kat.), THF, ΔT

(Nr. 2);¹⁵³ Mg, Jod (kat.), MeOH, ΔT (Nr. 3);¹⁵³ LiAlH₄, THF (Nr. 4);¹⁵⁴ NaBH₄, THF, ΔT (Nr. 5);¹⁵⁵ Zn, HCl, MeOH (Nr. 6);¹⁵⁶ H₂, Pd/C, TFA (Nr. 8); H₂, Pd/C verdünnte Lösung (Nr. 9). Die Umsetzung des Edukts wurde mittels HPLC verfolgt. Versuche Nr. 1-6 zeigten keinerlei oder nur wenig Umsetzung des Edukts. Nur die Versuche mit H₂, Pd/C zeigten vielversprechende Ergebnisse (Nr. 7) mit Ausbeuten um die 50 %. Um zu überprüfen, ob die entstandenen Amine den Katalysator vergiften und dadurch die Ausbeute verschlechtern, wurden zwei Versuche mit denselben Bedingungen angesetzt (Nr 8 und 9). Zu Versuch Nr. 8 wurde noch zusätzlich Trifluoressigsäure gegeben, um die entstehenden Amine zu protonieren. Wie in Abbildung 4-39 zu sehen führt der Zusatz der Trifluoressigsäure jedoch zu mehr Verunreinigungen und einer längeren Reaktionszeit als ohne Zusatz der Säure.

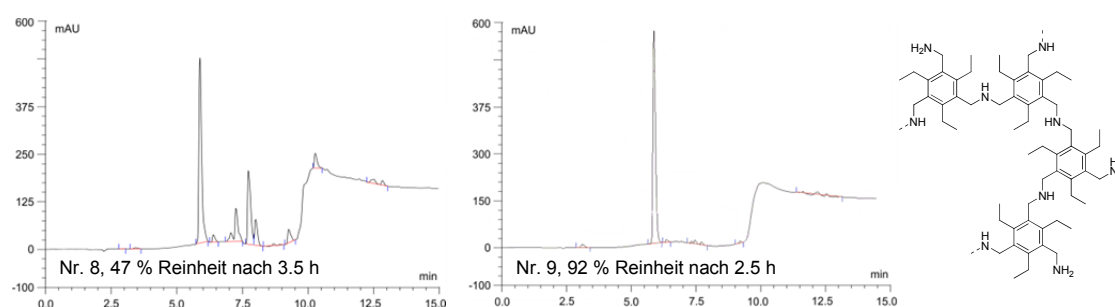


Abbildung 4-39: HPLC-Reaktionskontrollen der Versuche Nr. 8 und Nr. 9 mit Angabe der Reinheit und Reaktionsdauer. Beispielhafte Illustration eines möglichen polymeren Nebenprodukts, welches in konzentrierteren Reaktionslösungen entstehen könnte und Ursache für die schlechten Ausbeuten bei höheren Konzentrationen sein könnte (Nr. 7).

Weiter zeigte sich, dass abhängig von der Konzentration des Edukts die Ausbeute und die Reinheit des Produkts variierten. Je höher die Konzentration des Triazids desto schlechter war die Ausbeute. Der Grund für die niedrige Ausbeute könnte sein, dass je höher die Konzentration ist desto wahrscheinlicher findet eine Substitution eines Azids durch ein schon entstandenes Amin statt. Dies könnte zu einem verzweigten polymeren Netzwerk führen (s. Abbildung 4-39). Als optimale Bedingungen zur Synthese von Triamin **55** erwiesen sich eine $2 \cdot 10^{-2}$ molare Lösung von Triazid **63** in Methanol/Diethylether 1/2.5. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde der Katalysator (Pd/C) über einen Membranfilter (Nylon, 0.45 μ m) abfiltriert und das erhaltene Filtrat destillativ vom Lösemittel befreit. Triamin **55** wurde in einer Ausbeute von 90 % als freies Amin isoliert, um anschließend im nächsten Syntheseschritt geschützt zu werden (s. Abbildung 4-40).

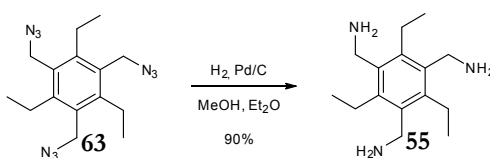


Abbildung 4-40: Reduktion des Triazids **63** zum Triamin **55** mit H₂ und Pd/C unter verdünnten Bedingungen ($2 \cdot 10^{-2}$ molare Lösung).

Die Gesamtausbeute über die zwei Syntheseschritte ausgehend vom Tribromid **61** beträgt somit 81 % (Ausbeute für die Reaktion zum Triazid beträgt 90 %, s. Abbildung 4-16) und ist somit um 33 % höher als die Ausbeute der zuvor durchgeführten literaturbekannten Synthese.

Die Bedingungen für die Reduktion und die folgende Aufarbeitung wurden so gewählt, dass das Produkt als freies Amin für die anschließende Kupplung erhalten wurde. Erfahrungen im Arbeitskreis zeigen, dass das Schützen von Aminen oder die Kupplung von Aminosäuren häufig mit höheren Ausbeuten und kürzeren Reaktionszeiten verlaufen, wenn die freien Amine anstelle der Ammoniumsalze eingesetzt werden.

Für den in Lösung zu synthetisierenden Rezeptor wurden *L*-Serin und *L*-Phenylalanin als Aminosäuren für den Aufbau der Rezeptorarme am Templat **55** gewählt. Die Synthese des Rezeptors in Lösung wurde nach der vorgestellten Synthesestrategie ausgehend vom Triamin **55** begonnen. Für die erste Kupplung wurden Boc-Ser(Bzl)-OH, Diisopropylcarbodiimid und Cl-HOBt in Dimethylformamid gelöst und für 10 min voraktiviert. Anschließend wurde Triamin **55** zugegeben und die Reaktionslösung bei 95 °C gerührt. Nach Ausfällen mit Wasser wurde das Rohprodukt chromatographisch gereinigt und Produkt **74** in einer Ausbeute von 81 % isoliert (s. Abbildung 4-41).

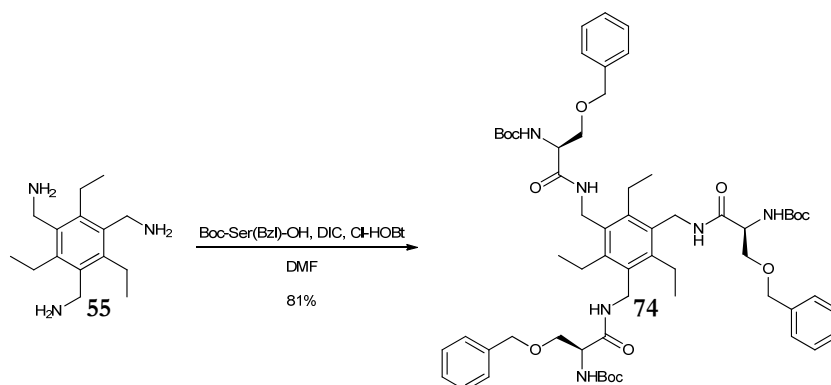


Abbildung 4-41: Kupplungsreaktion von Boc-Ser(Bzl)-OH mit Triamin **55** zu **74**.

Die darauffolgende Entschützung der Boc-Schutzgruppen erfolgte in einem Gemisch aus Salzsäure und Trifluoressigsäure im Verhältnis 3 zu 1 in Tetrahydrofuran. Die HPLC-Reaktionskontrolle zeigte nach 1.5 h eine vollständige Umsetzung des Edukts an. Nach destillativem Entfernen des Lösemittels wurde das Rohprodukt chromatographisch gereinigt, mit verdünnter Salzsäure lyophilisiert, um das Chloridsalz zu erhalten. Produkt **75** wurde so in einer Ausbeute von 82 % isoliert (s. Abbildung 4-42). Mittels eines Ionentauschers konnte Verbindung **75** zusätzlich in Form der freien Amine erhalten werden.

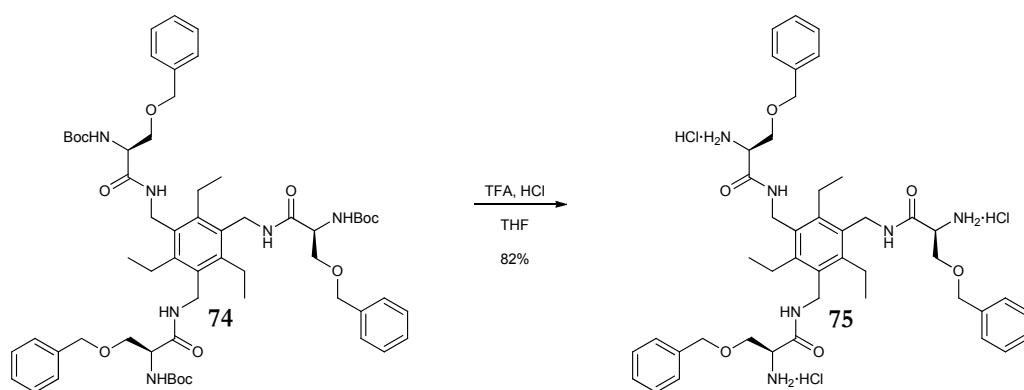


Abbildung 4-42: Entschützung der Boc-Schutzgruppen von **74** zu **75**.

Im nächsten Syntheseschritt hin zum Rezeptor mit zwei Aminosäuren in den Rezeptorarmen wurde *Ac-L-Phe-OH* mit Verbindung **75** in Form der freien Amine unter denselben Bedingungen wie zuvor die Kupplung von *Boc-Ser(Bzl)-OH* gekuppelt. Nach dem Ausfällen des Rohprodukts mit Wasser wurde dieses chromatographisch gereinigt. Die Ausbeute betrug allerdings nur 20 % und die Produktfraktion war vermutlich mit isomeren Nebenprodukten verunreinigt, da im HPLC-Chromatogramm ein weiterer Hauptpeak die Masse des Produkts aufweist. Allem Anschein nach erweist sich die Kupplung der zweiten Aminosäure und deren Reinigung schwieriger als erwartet. Kupplungen von Phenylalanin verlaufen im Allgemeinen ohne unerwünschte Nebenreaktionen bzw. Racemisierung. Um die zweite Kupplung des *Ac-Phe-OH* zu umgehen, wurde der zweite in Abbildung 4-38 vorgestellte Syntheseweg eingeschlagen. Hier werden zunächst die beiden Aminosäuren gekuppelt, um das so erhaltene Dipeptid schließlich mit dem Triamin **55** zu verknüpfen. Der erste Kupplungsversuch von *Ac-Phe-OH* und *H-Ser(*t*Bu)-OPhe·HCl* wurde mit PyBOP und Diisopropylethylamin in Dimethylformamid durchgeführt. Das mit Wasser ausgefällte Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt, mit einer Ausbeute von 94 % isoliert und anschließend charakterisiert. Das Massenspektrum zeigt das Produkt **76**. Allerdings sind sowohl im HPLC-UV-Spektrum als auch im NMR-Spektrum zu erkennen, dass etwa ein eins zu eins Gemisch der Diastereomere **76** und **77** vorliegt (s. Abbildung 4-43).

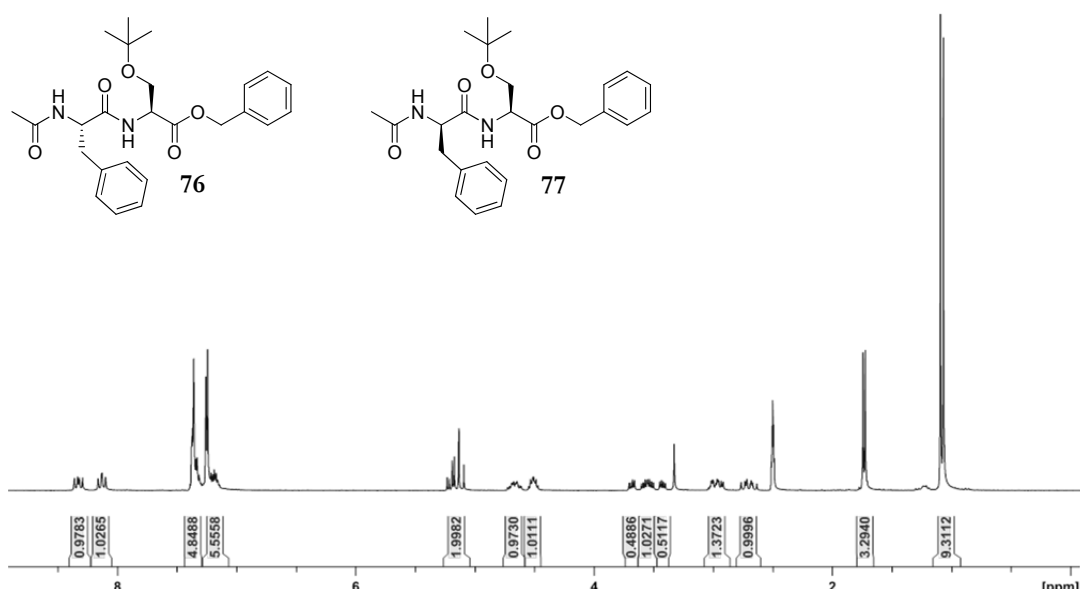


Abbildung 4-43: NMR-Spektrum des gereinigten Diastereomerengemisches und Strukturen der Diastereomer 76 und 77.

Da auch bei der vorherigen Reaktion Phenylalanin isomerisierte, wird vermutet, dass auch bei der Kupplung der beiden Aminosäuren Phenylalanin racemisiert. Um die Entstehung der diastereomeren Dipeptide zu verhindern wurden die Kupplungsbedingungen, d. h. die Wahl der Base, des Lösemittels und Kupplungsreagenzien, sukzessive variiert (s. Abbildung 4-44).

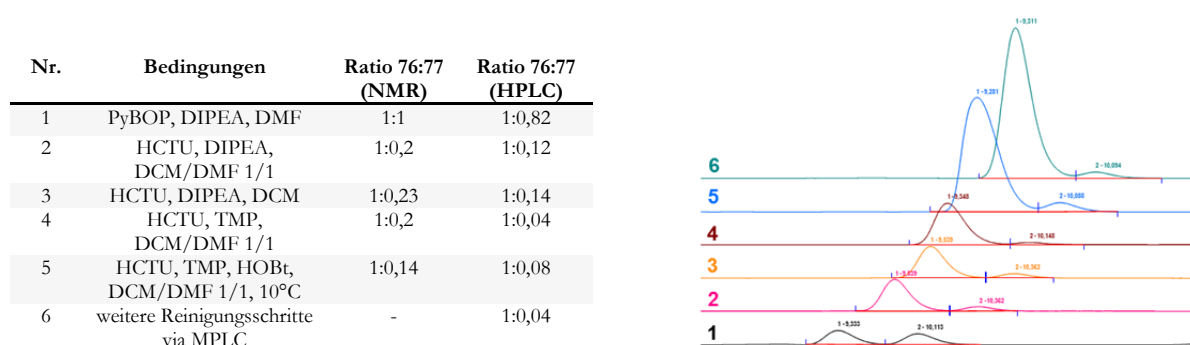


Abbildung 4-44: Auflistung der verschiedenen Reaktionsbedingungen zur Optimierung des Diastereomerenverhältnisses 76:77 mit Abbildung der entsprechenden HPLC-Chromatogramme des jeweiligen Produktgemisches.

Zunächst wurde das Kupplungsreagenz PyBOP durch HCTU ersetzt und das Lösemittel von reinem Dimethylformamid zu einem eins zu eins Gemisch aus Dichlormethan und Dimethylformamid geändert. HCTU bildet einen weniger aktiven Aktivester als PyBOP, womit die Epimerisierung verlangsamt bzw. komplett unterbunden werden kann. Wie NMR-Spektrum und HPLC-UV-Spektrum zeigten konnte das Verhältnis von zuvor 1 zu 1 deutlich auf 1 zu 0.12 verbessert werden (Nr. 2). Im nächsten Versuch wurde Dimethylformamid vollständig durch Dichlormethan ersetzt. Diese Bedingungen führten jedoch zu einer leichten Verschlechterung des Diastereomerenverhältnisses und zu Löslichkeitsproblemen während der Reaktion (Nr. 3). Daher wurde im nächsten Versuch wieder das Lösemittelgemisch

Dichlormethan und Dimethylformamid im Verhältnis eins zu eins verwendet und die Base Diisopropylethylamin (DIPEA, pK_s 10.1) durch die schwächere Base 2,4,6-Trimethylpyridin (TMP, pK_s 7.43) ersetzt. Wie in Versuch Nr. 4 zu sehen ließ sich durch den Einsatz der schwächeren Base das Verhältnis nochmals verbessern. Allerdings brachten weitere Optimierungsversuche wie der Zusatz von Cl-HOBt oder das Absenken der Reaktionstemperatur keine weiteren Verbesserungen (Nr. 5). Auch ließ sich das Diastereomerenmisch nicht per MPLC auftrennen. Somit wurde die Kupplung der beiden Aminosäuren Ac-Phe-OH und H-Ser(*t*Bu)-OPhe·HCl unter den Bedingungen wie in Versuch Nr. 5 durchgeführt und Dipeptid **76** konnte in einer Ausbeute von 93 % und einem Diastereomerenverhältnis von 1 zu 0.04 isoliert werden (s. Abbildung 4-45). Die Entschützung von **76** erfolgte in Methanol mit Pd/C unter Wasserstoffatmosphäre. Nach Abfiltrieren des Katalysators über einen Membranfilter und destillativem Entfernen des Lösemittels wurde Produkt **78** quantitativ isoliert (s. Abbildung 4-45).

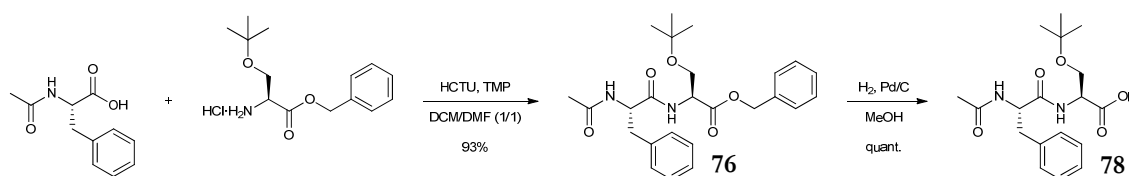


Abbildung 4-45: Kupplung der beiden Aminosäuren Ac-Phe-OH und H-Ser(*t*Bu)-OPhe·HCl zum Dipeptid **76** unter den ermittelten optimierten Reaktionsbedingungen, gefolgt von der Entschützung zu **78**.

Der Syntheseroute folgend wurde das entschützte Dipeptid **78** mit Triamin **55** gekuppelt. Die Kupplung wurde in Dimethylformamid mit Cl-HOBt und Diisopropylcarbodiimid als Kupplungsreagenzien bei 96 °C Badtemperatur durchgeführt. Nach Ausfällen mit Wasser wurde das Rohprodukt chromatographisch über Normalphase gereinigt und Produkt **79** in einer Ausbeute von 79 % erhalten (s. Abbildung 4-46).

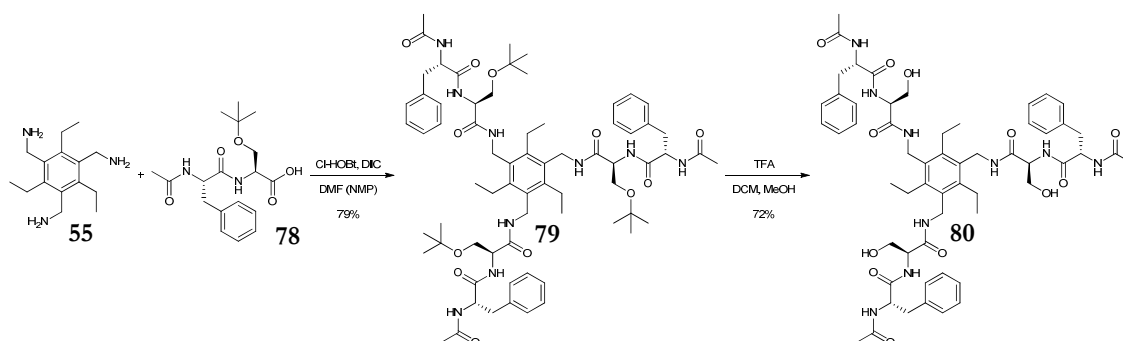


Abbildung 4-46: Kupplung des entschützten Dipeptids **78** mit Triamin **55** zu **79**. Anschließende Abspaltung der Schutzgruppen zur Synthese des Rezeptors **80**.

Die darauffolgende Entschützung der *tert*-Butylethergruppen erfolgte mit Trifluoressigsäure. Nach Ausfällen mit Wasser konnte Produkt **80** in einer Ausbeute von 72 % isoliert werden (s.

Abbildung 4-46). Allerdings stellte sich heraus, dass **80** nicht in Wasser löslich ist sondern nur in Dichlormethan/Methanol 9/1 bzw. in Dimethylsulfoxid. Somit ist Rezeptor **80** nicht für Bindungsstudien im wässrigen Medium geeignet.

Um das Löslichkeitsproblem des Rezeptors **80** zu umgehen, sollte anstelle des Ac-Phe-OH eine Aminosäure bzw. eine künstliche Aminosäure gekuppelt werden, die die Löslichkeit fördert aber auch zur Bindung beitragen kann. Hierfür wurde die künstliche Aminosäure **81** als eine Variante eines verkürzten Lysin ausgewählt (s. Abbildung 4-47). Spätere Studien finden unter biologischen Bedingungen, bei pH 7 statt, so dass Amine protoniert vorliegen. Durch die Protonierung des Amins wird die Löslichkeit gefördert und gleichzeitig kann die Ammoniumgruppe als Wasserstoffbrücken-Donor fungieren. Abbildung 4-47 zeigt den gewählten Syntheseweg zum geschützten Produkt **83**, welches entsprechend für die darauffolgende Kupplung orthogonal mit einer Cbz-Schutzgruppe in der Seitenkette und einer Boc-Schutzgruppe geschützt ist.

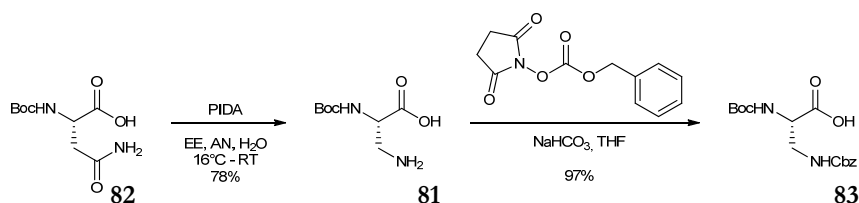


Abbildung 4-47: Hofmannabbau von Boc-Asparagin **82** zu **81** und anschließende Einführung der Cbz-Schutzgruppe.

Der Hofmannabbau des Boc-geschützten Asparagins **82** erfolgte nach Literaturvorschrift mit PIDA in einem Lösemittelgemisch aus Essigester, Acetonitril und Wasser. Das im Laufe der Reaktion ausgefallene Produkt **81** wurde abfiltriert, gewaschen und konnte in einer Ausbeute von 78 % erhalten werden.¹⁵⁷ Im darauffolgenden Syntheseschritt soll das Amin mit einer Cbz-Schutzgruppe versehen werden. Die Einführung der Cbz-Schutzgruppe wurde in einem Lösemittelgemisch aus Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Tetrahydrofuran (4/1) durch Zutropfen von Z-Osu in Tetrahydrofuran zum gelösten Edukt **81** durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit verdünnter Salzsäure auf pH 4 gebracht und mit Dichlormethan gewaschen. Beim Waschen mit Dichlormethan fiel in der organischen Phase ein kristalliner Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Nach destillativem Entfernen des Lösemittels der organischen Phase wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographisch über RP18 mit Wasser/Methanol unter TFA-Zusatz gereinigt. Die beiden erhaltenen Produkte, der Niederschlag in der organischen Phase (**83-1**) und das gesäulte Produkt (**83-2**), wurden NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch untersucht. Im Massenspektrum ist für beide erhaltenen Feststoffe der Produktpeak für Verbindung **83** enthalten, während die NMR-Spektren leichte Unterschiede aufwiesen. Zusätzlich sei schon an dieser Stelle erwähnt, dass nur

einer der beiden Feststoffe (**83-1**) im nächsten Syntheseschritt, der Kupplung mit Verbindung **75**, zum gewünschten Produkt **84** reagierte. Abbildung 4-48 zeigt den Bereich der NMR-Spektren des Feststoffs der organischen Phase (**83-1**) und des chromatographisch gereinigten Feststoffs (**83-2**), indem die Unterschiede liegen. Wie zu sehen unterscheiden sich die beiden Spektren in der Verschiebung der Amidsignale.

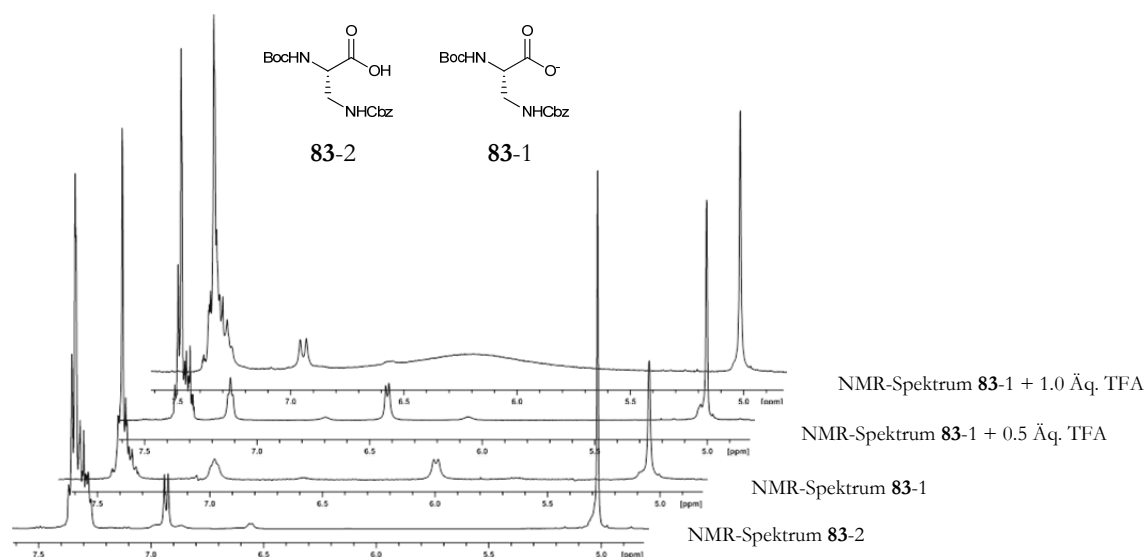


Abbildung 4-48: NMR-Spektren der Verbindungen **83-1**, **83-2**, **83-1** + 0.5 Äq. TFA und **83-1** + 1.0 Äq. TFA.

Bei dem Spektrum der Verbindung **83-1** liegen die Amidsignale bei 5.9 und 6.9 ppm und bei Verbindung **83-2** bei 6.9 und 7.3 ppm unter dem Signal der aromatischen Wasserstoffatome des Benzylrings. Durch Zugabe von 0.5 und 1.0 Äquivalenten Trifluoressigsäure zu Verbindung **83-1** zeigte sich, dass die Amidsignale eine Tieffeldverschiebung erfahren und somit der Unterschied zwischen **83-1** und **83-2** allein im Protonierungsgrad liegt (s. Abbildung 4-48). Wie schon zuvor erwähnt ließ sich im nächsten Syntheseschritt jedoch nur Verbindung **83-1**, die als Carboxylat vorliegt, erfolgreich kuppeln. Auch durch die Zugabe von Triethylamin zur Reaktion von **83-2** konnte keine erfolgreiche Umsetzung zum gewünschten Produkt erzielt werden. Um daher das Carboxylat (**83-1**) zu isolieren wurde zur Aufarbeitung auf die Zugabe von Säure verzichtet, das Lösemittel destillativ entfernt und das Rohprodukt chromatographisch über RP18 mit Wasser/Methanol ohne TFA-Zusatz gereinigt. Dem Syntheschema weiter folgend wurde Verbindung **83** (als Natriumsalz) mit **75** als freiem Amin in Dimethylformamid unter Zugabe von Diisopropylcarbodiimid und Cl-HOBt bei 96 °C Badtemperatur gekuppelt. Verbindung **75** wurde in Form der freien Amine gekuppelt, da Erfahrungen im Arbeitskreis zeigen, dass sich freie Amine oft in besseren Ausbeuten kuppeln lassen als ihre Ammoniumsalze. Nach Ausfällen mit Wasser wurde das Rohprodukt **84** chromatographisch über Normalphase gereinigt und konnte in einer Ausbeute von 77 % isoliert werden (s. Abbildung 4-49). Die darauffolgende Entschützung der drei Boc-Gruppen

erfolgte mit Salzsäure und Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Nachdem per HPLC-Reaktionskontrolle die vollständige Umsetzung des Edukts **84** festgestellt wurde, konnte durch destillatives Entfernen des Lösemittels und Lyophilisieren mit Salzsäure-Zugabe das Produkt **85** als Chloridsalz in einer Ausbeute von 75 % erhalten werden (s. Abbildung 4-49).

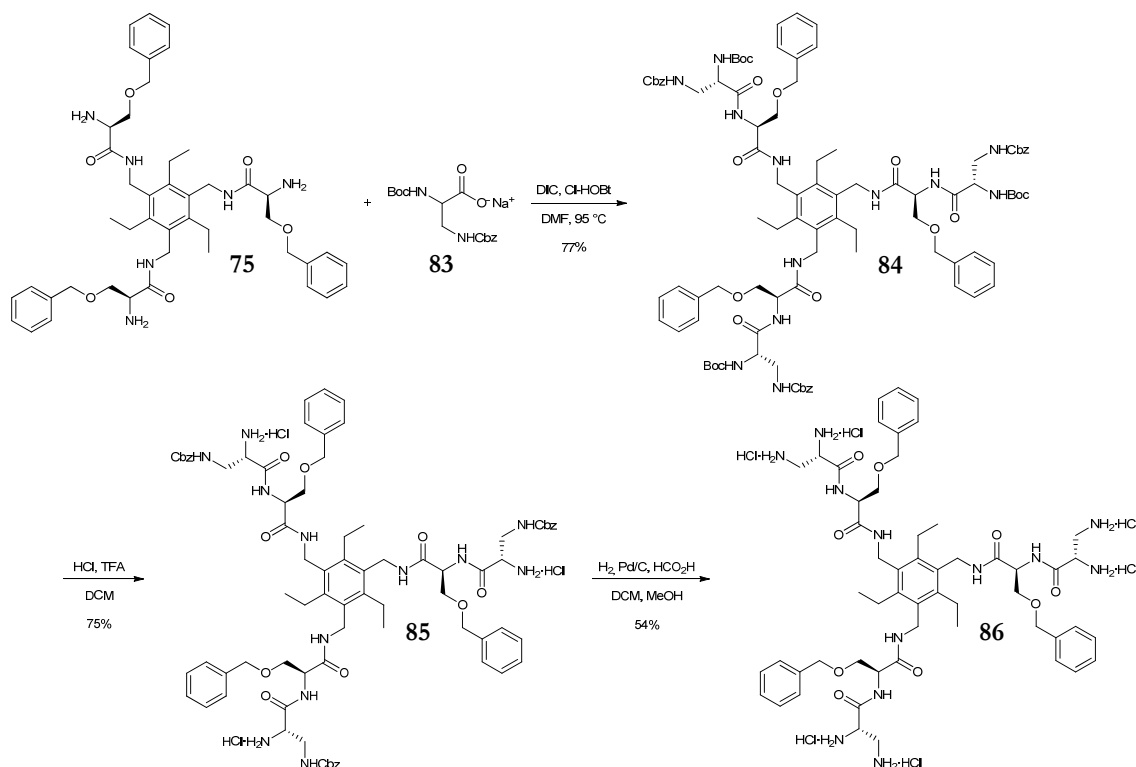


Abbildung 4-49: Synthese des Rezeptors **86** über Kupplung von **75** mit **83** gefolgt von Boc- und Cbz-Entschützung.

Rezeptor **85**, dessen Arme aus je zwei Aminosäuren aufgebaut sind, wäre schon als potentieller Rezeptor geeignet, ist aber trotz der drei positiven Ladungen nicht wasserlöslich. Dennoch ist Rezeptor **85** auch eine mögliche Ausgangsverbindung für die Synthese eines Rezeptors in Lösung mit drei Aminosäuren pro Rezeptorarm. Um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen, wurden die Cbz-Schutzgruppen abgespalten. Die Entschützung der Cbz-Schutzgruppe mit Pd/C als Katalysator und Ameisensäure in Dichlormethan/Methanol im Verhältnis von eins zu eins unter Wasserstoffatmosphäre lieferte nach chromatographischer Reinigung über RP18-Material Rezeptor **86** in einer Ausbeute von 54 % und einer Reinheit von 92 %. Rezeptor **86** ist im Gegensatz zu Rezeptor **85** wasserlöslich und kann in Bindungsstudien auf sein Potential hin untersucht werden. Zum Vergleich mit Rezeptor **85** wurde auch Verbindung **75** für Bindungsstudien in Betracht gezogen. Ebenso wurden die Schutzgruppen von Verbindung **75** abgespalten, um eine weitere Vergleichsverbindung zu erhalten (s. Abbildung 4-50).

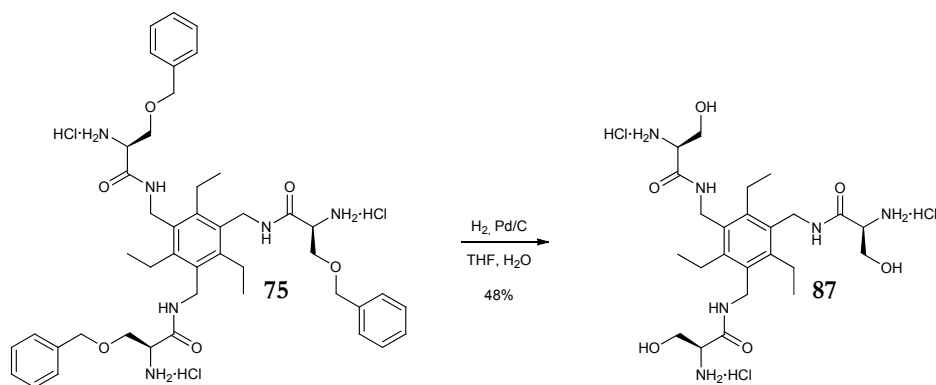


Abbildung 4-50: Entschützung der Benzylether-Schutzgruppen von Verbindung **75** zur Synthese der Verbindung **87**.

Die Entschützung der Benzylether-Schutzgruppen erfolgte in einer eins zu eins Mischung aus Wasser und Tetrahydrofuran unter Wasserstoffatmosphäre und durch Zugabe von Pd/C. Die Reaktion wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Entschützung der drei Benzylether per HPLC-Kontrolle verfolgt. Nach chromatographischer Reinigung konnte das Produkt **87** in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Als weitere Vergleichsverbindung neben **87** wurde derselbe Rezeptor mit Glycin anstelle von Serin synthetisiert (s. Abbildung 4-51)

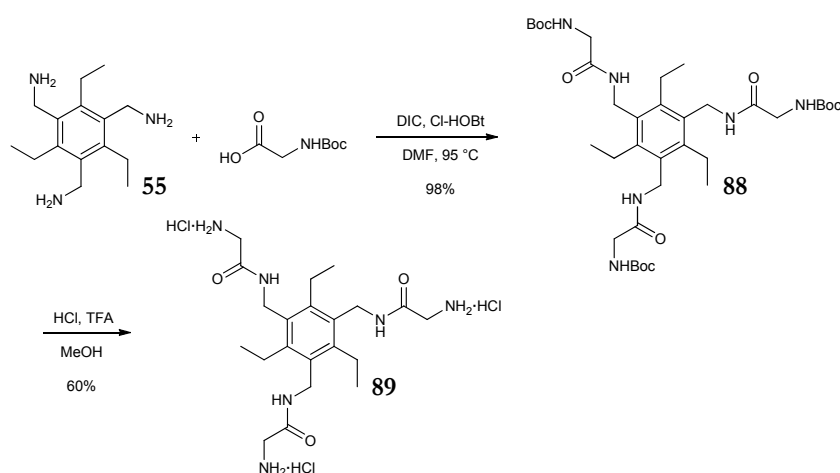


Abbildung 4-51: Synthese des Vergleichsrezeptors **89** über Kupplung von Boc-Gly-OH mit Triamin **55** zu Verbindung **88** gefolgt von der Entschützung der Boc-Schutzgruppen.

Zur Synthese von Verbindung **89** wurde Triamin **55** mit Boc-Gly-OH unter Zugabe von DIC und Cl-HOBt in Dimethylformamid bei 95 °C gekuppelt. Nach Zugabe von Wasser wurde das ausgefallene Rohprodukt **88** mittels Normalphasen-Chromatographie (DCM/MeOH/TEA 9.5/0.5/0.1 %) gereinigt und in einer Ausbeute von 98 % isoliert. Die anschließende Entschützung der Boc-Schutzgruppen erfolgte mit Salzsäure und Trifluoressigsäure in Methanol. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels und lyophilisieren unter Salzsäure-Zugabe wurde Produkt **89** mit einer Ausbeute von 60 % isoliert.

Nach dem vorgestellten Syntheschema in Abbildung 4-38 wurden die Rezeptoren **80**, **85** und **86** und die Vergleichsrezeptoren **75**, **87** und **89** im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert. (s. Abbildung 4-52). Alle Rezeptoren besitzen jeweils drei identische Arme, pro Arm zwei bzw. eine Aminosäure und sind bis auf die Rezeptoren **85** und **80** in Wasser vollständig löslich.

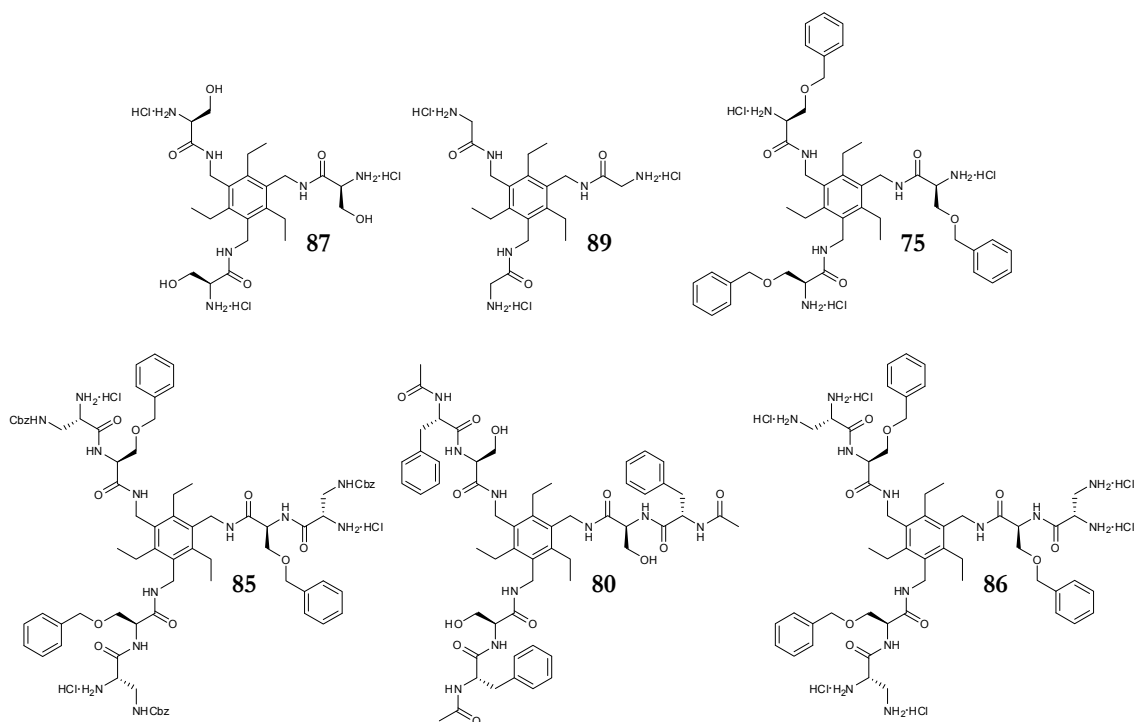


Abbildung 4-52: Strukturen der Rezeptoren **75**, **80**, **85**, **86**, **87** und **89**.

Um auch in Lösung neben den symmetrischen Rezeptoren unsymmetrische Rezeptoren mit unterschiedlichen Armen in Lösung synthetisieren zu können, wurde die Rezeptorsynthese ausgehend von der geschützten Verbindung **56** begonnen. Abbildung 4-53 zeigt nochmals die vorgestellte Synthesestrategie zur Synthese unsymmetrischer Rezeptoren in Lösung.

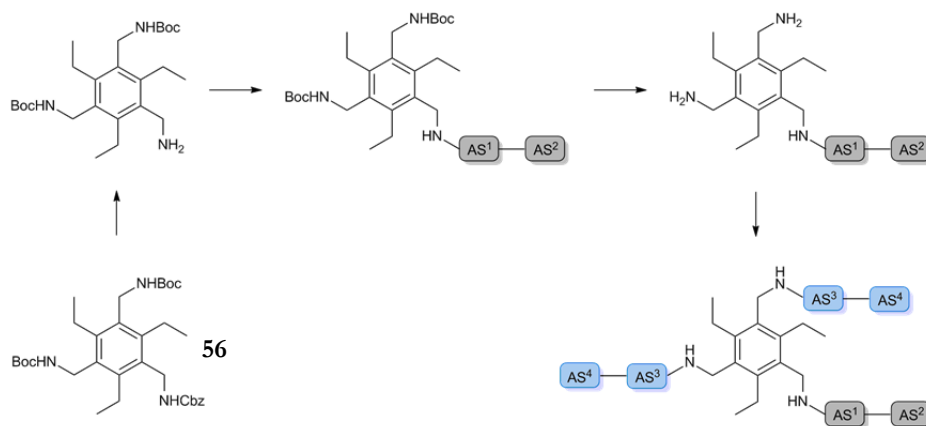


Abbildung 4-53: Illustration der Synthese der unsymmetrischen Rezeptoren mit zwei gleichen und einem unterschiedlichen Arm in Lösung mit dem orthogonal geschützten Templat **56**.

Die orthogonalen Schutzgruppen des Templats **56** erlauben die separate Verknüpfung der Rezeptorarme. Abbildung 4-54 zeigt die vollständige Synthese der unsymmetrischen Rezeptoren **90** und **91** in Lösung.

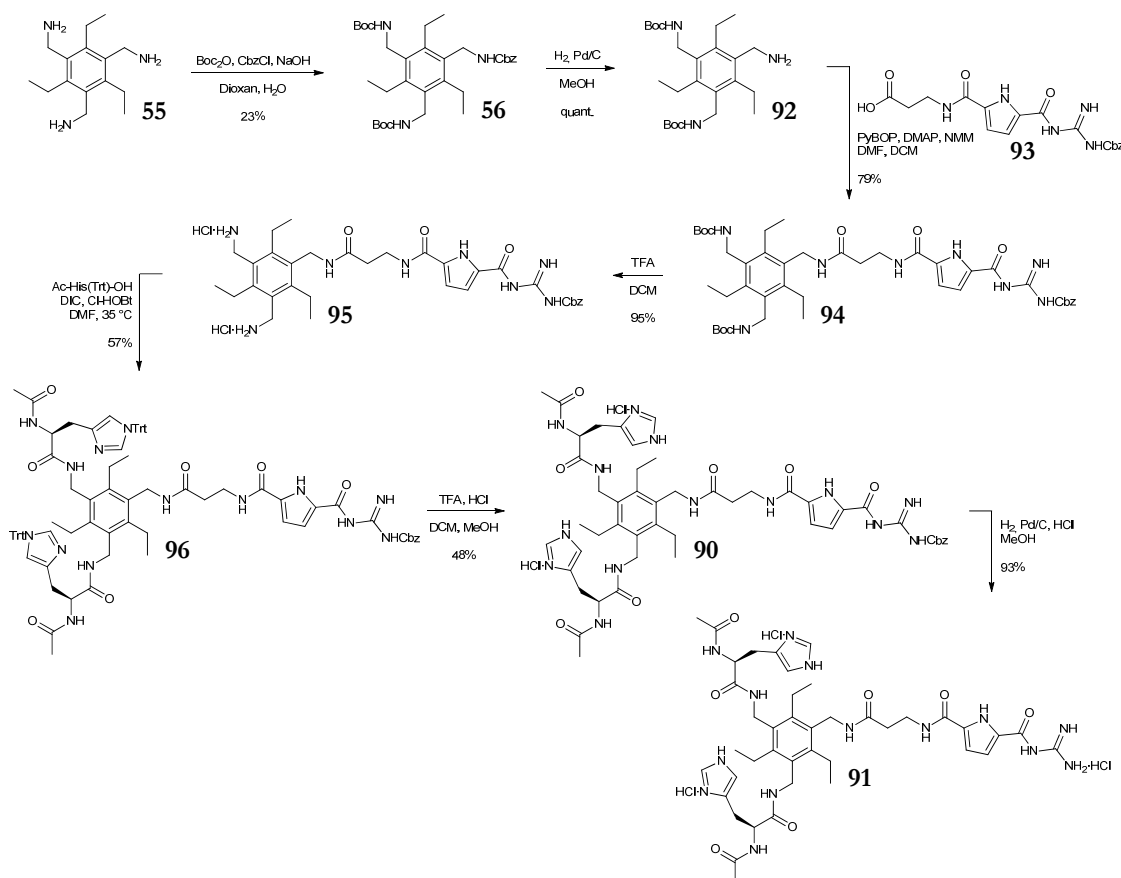


Abbildung 4-54: Synthese der beiden unsymmetrischen Rezeptoren **90** und **91** in Lösung.

Zwei der Rezeptorarme sind aus der Aminosäure Histidin aufgebaut, während der dritte Arm aus einem über eine Spacer verknüpften Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein besteht, einmal in seiner geschützten (**90**) und einmal in seiner entschützten Form (**91**). Der Guanidiniocarbonylpyrrol-Baustein stellt ein Argininanalogon dar, welches sich sowohl bei der Bindung von Carboxylaten als auch bei der Bindung der DNA und verschiedenen Polynukleotiden bereits als sehr effektiv erwiesen hat.¹⁶⁸ Die Verbindungen **92** und **93** wurden nach literaturbekannter Synthesevorschrift synthetisiert.¹³¹ Ausgehend vom Triamin **55** wurde die orthogonal geschützte Verbindung **56** in einer statistischen Schützung mit einer Ausbeute von 23 % isoliert. Die folgende Entschützung der Cbz-Schutzgruppe ergab **92** in quantitativer Ausbeute. Der für den nächsten Syntheseschritt benötigte Baustein **93** wurde wie in Abbildung 4-55 gezeigt synthetisiert.

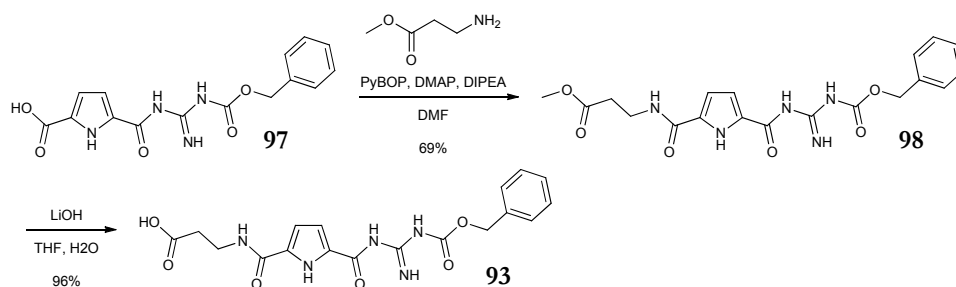


Abbildung 4-55: Synthese des Argininanalogons **93** ausgehend von der Pyrrolcarbonsäure **97**.^{158,136}

Die Pyrrolcarbonsäure **97**¹⁵⁸ wurde mit Methylester-geschütztem β -Alanin gekuppelt. Die Kupplung wurde mit PyBOP, DMAP und DIPEA in Dimethylformamid durchgeführt. Nach Ausfällen des Rohprodukts **98** mit eisgekühltem Wasser wurde der erhaltene Niederschlag abfiltriert, chromatographisch gereinigt (SiO_2 , Essigester/DCM 8/2) und Produkt **98** in einer Ausbeute von 69 % isoliert. Die Entschützung des Methylesters wurde mit Lithiumhydroxid in Tetrahydrofuran und Wasser durchgeführt. Nachdem die Reaktionskontrolle die vollständige Umsetzung des Edukts anzeigte, wurde das Lösemittel destillativ entfernt und durch Zugabe von Wasser und Salzsäure das Produkt **93** ausgefällt und in einer Ausbeute von 96 % isoliert. Der auf diesem Weg synthetisierte Baustein **93** wurde mit PyBOP, DMAP und NMM in Dimethylformamid und Dichlormethan gekuppelt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (RP18, 70 % Methanol zu 100 % Methanol in 35 min) gereinigt und **94** in einer Ausbeute von 79 % isoliert. Die folgende Entschützung der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan und ergab nach destillativer Entfernung des Lösemittels und Lyophilisieren unter Zugabe von Salzsäure das Produkt **95** in einer Ausbeute von 95 %. Der folgende Syntheseschritt ist die Kupplung der Histidine an **95**. Histidin gehört bezüglich der Durchführung der Kupplung mit zu den problematischsten Aminosäuren in der Peptidsynthese.^{129,139} Die zwei Hauptprobleme, die beim Einsatz von Histidin auftreten, sind Acylierung und Epimerisierung. Die Acylierung der Histidinseitenkette während Kupplungsreaktionen lässt sich in der Regel durch Verwendung einer Schutzgruppe vermeiden. Schutzgruppen für die Histidinseitenkette, die sich auch unter relativ milden Bedingungen wieder abspalten lassen, sind sowohl die Boc- als auch die Tritylschutzgruppe. Die Tritylschutzgruppe lässt sich mit 95 % TFA bei Raumtemperatur abspalten während Boc-Schutzgruppen in der Regel schon mit 50 % TFA abgespalten werden. Gegen das Problem der Epimerisierung haben sich Tritylgruppen als effektiv erwiesen. Eine Ausnahme bilden Kupplungsreaktionen, die aufgrund sterischer Hinderung oder Aggregation schleppend verlaufen.¹³⁹ Um dies zu vermeiden wurde zunächst überlegt, die Boc-Schutzgruppe zu verwenden. Da die geschützte Aminosäure Ac-His(Boc)-OH kommerziell nicht erhältlich ist, wurde zunächst versucht, das acetylierte Histidin (Ac-His-OH) mit einer Boc-Schutzgruppe zu

versehen. Hierzu wurde Ac-His-OH mit einer Natriumhydroxidlösung in Dioxan gelöst und im Eisbad eine Lösung von Boc-Anhydrid in Dioxan zu getropft. Nach Aufarbeitung der Reaktionslösung wurde Ac-His(Boc)-OH in einer Ausbeute von 7 % isoliert. Aufgrund der sehr schlechten Ausbeute wurde schließlich entschieden, die Kupplung mit dem kommerziell erhältlichen Ac-His(Trt)-OH durchzuführen. Da es bei der Kupplung von Histidin häufig, abhängig von den Reaktionsbedingungen trotz Schutzgruppen, wie bereits erwähnt zu Nebenreaktionen kommt, wurde zunächst Ac-His(Trt)-OH mit Triamin **55** unter unterschiedlichen Bedingungen gekuppelt, um optimale Reaktionsbedingungen für die eigentliche Kupplungsreaktion zu ermitteln. Triamin **55** wurde als Testedukt gewählt, da die Ähnlichkeit zum eigentlichen Edukt **95** gegeben ist und so auch bei der Testkupplung nicht nur die Epimerisierung sondern auch die Ausbeute verfolgt werden kann. Wie schon zuvor beschrieben, scheinen die Amine des Triamins **55** in Kupplungsreaktionen relativ träge zu reagieren. Die geeigneten Bedingungen, um dennoch gute Ausbeuten zu erzielen, waren der Einsatz von hohen Temperaturen (96 °C) und DIC und Cl-HOBt als Kupplungsreagenzien. Die Reagenzien DIC und Cl-HOBt sind sehr reaktive Reagenzien, die eine effektive Kupplung ermöglichen sollten. Allerdings ist eine Temperatur von 96 °C vermutlich zu hoch um Histidine ohne Nebenreaktionen oder Zersetzung zu kuppeln. Daher wurden zunächst die in Abbildung 4-56 beschriebenen Bedingungen bei Raumtemperatur und bei 45 °C getestet und der Grad der Epimerisierung mittels HPLC-Kontrolle verfolgt.

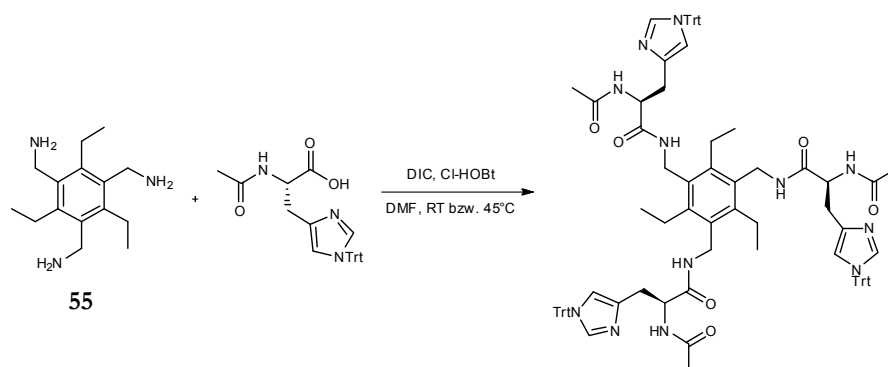


Abbildung 4-56: Synthese zur Ermittlung geeigneter Bedingungen zur Kupplung von Ac-His(Trt)-OH mit Verbindung **95**.

Da die Ausbeuten der beiden Tests unabhängig von der Temperatur um 50 % lagen, bei 45 °C aber vermutlich Epimerisierung auftrat, wurden für die Kupplung von Verbindung **95** mit Ac-His(Trt)-OH, DIC und Cl-HOBt als Kupplungsreagenzien gewählt und die Kupplung bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Entschützung der Tritylschutzgruppen mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Salzsäure in Dichlormethan/Methanol konnte Rezeptor **90** in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Die Entschützung der Cbz-Schutzgruppe zur

Synthese des Rezeptors **91** erfolgte mit Pd/C in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre. Rezeptor **91** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in eine Ausbeute von 93 % isoliert (s. Abbildung 4-54).

Neben den beiden dreiarmligen unsymmetrischen Rezeptoren **90** und **91** wurden noch weitere Vergleichsrezeptoren, insbesondere in Hinblick auf die Bindung der DNA-Furchen, synthetisiert. Abbildung 4-57 zeigt die ein- und zweiarmligen Vergleichsrezeptoren **99** bis **103**.

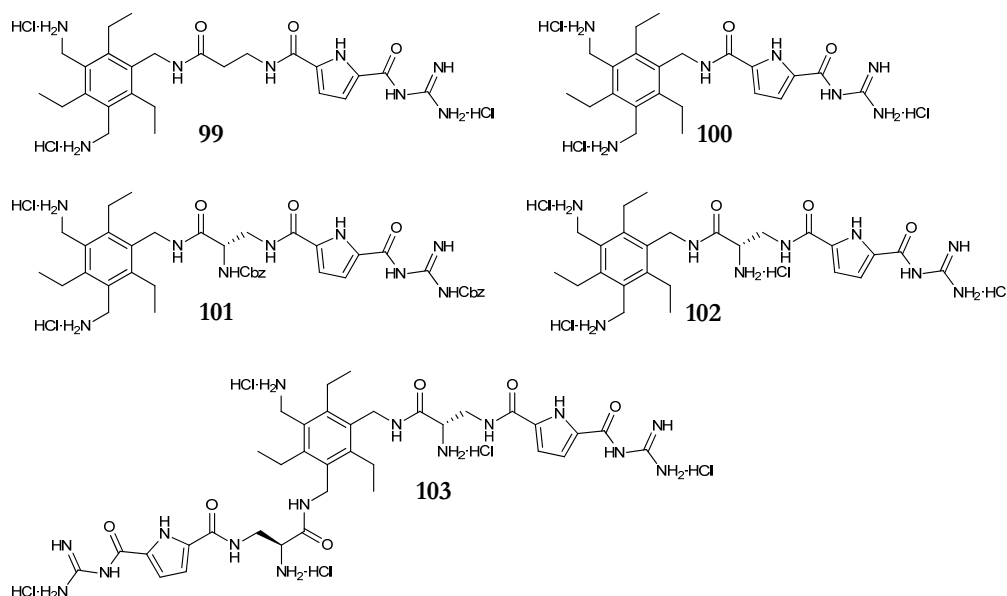


Abbildung 4-57: Struktur der ein- und zweiarmligen Vergleichsrezeptoren **99**, **100**, **101**, **102** und **103**.

Rezeptor **99** wurde ausgehend von Verbindung **94** erhalten. In zwei Syntheseschritten ohne Reinigung des ersten Produktes wurde zuerst mit Palladium/Kohle in Methanol und unter Wasserstoffatmosphäre die Cbz-Schutzgruppe entschützt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösemittel destillativ entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst und die Boc-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure und Salzsäure abgespalten. Nach Aufarbeitung und Lyophilisieren wurde Rezeptor **99** in einer Ausbeute von 79 % erhalten (s. Abbildung 4-58).

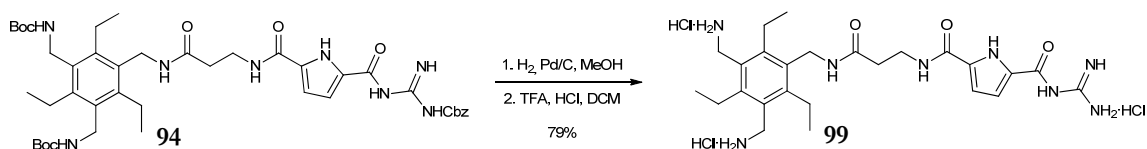


Abbildung 4-58: Synthese des Rezeptors **99** ausgehend von Verbindung **94**.

Rezeptor **100** wurde durch Kupplung von Verbindung **92** mit Pyrrolcarbonsäure **97** und nachfolgender Entschützung der Schutzgruppen erhalten (s. Abbildung 4-59).

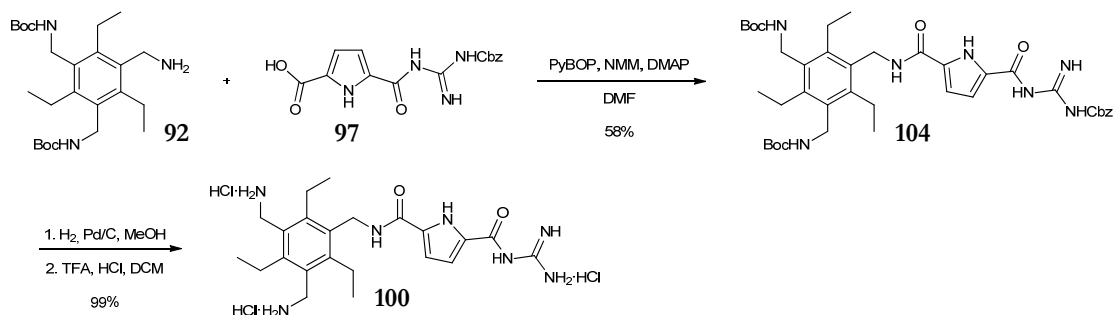


Abbildung 4-59: Synthese des Rezeptors **100** ausgehend von den Verbindungen **92** und **97**.

Die Kupplung wurde mit PyBOP, NMM und DMAP in Dimethylformamid durchgeführt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurde Verbindung **104** in einer Ausbeute von 58 % erhalten. Die Entschützung der Schutzgruppen erfolgte wie zuvor bei der Synthese des Rezeptors **99** direkt hintereinander ohne Reinigung des Zwischenprodukts. Rezeptor **100** wurde in einer Ausbeute von 99 % isoliert.

Rezeptor **101** wurde nach dem in Abbildung 4-60 gezeigten literaturbekannten Syntheschema synthetisiert.¹³¹

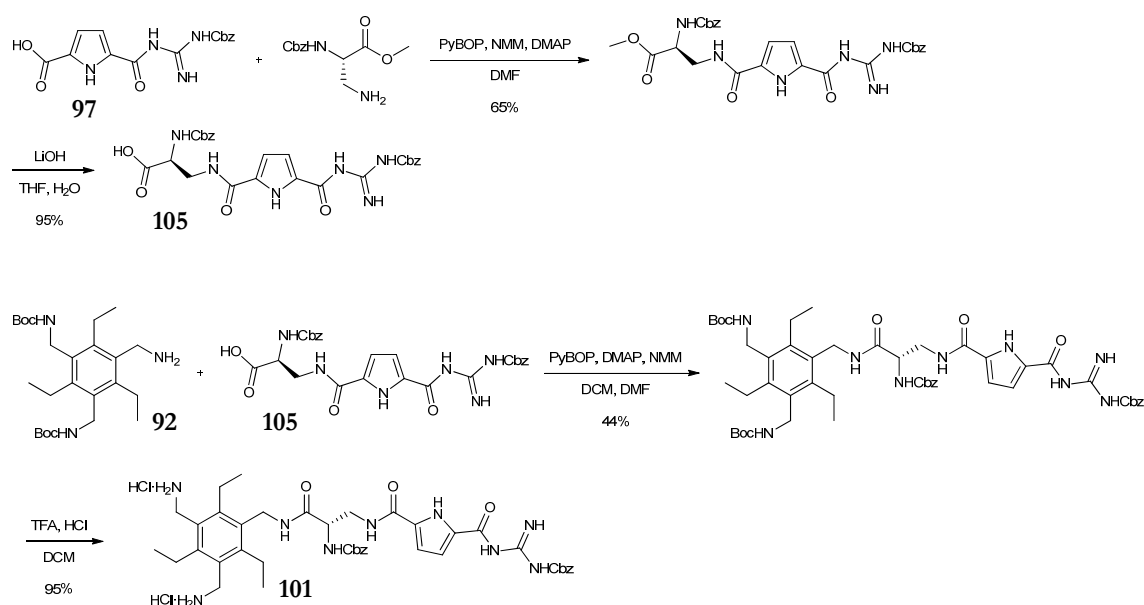


Abbildung 4-60: Synthese der Verbindung **105** und Synthese des Rezeptors **101** durch Kupplung von Verbindung **92** mit **105** mit nachfolgender Entschützung.¹³¹

Die Synthese ließ sich wie in der Literatur beschrieben ohne Probleme und mit vergleichbaren Ausbeuten durchführen.

Zur Synthese des Rezeptors **102** wurde in einem weiteren Schritt ausgehend von Rezeptor **101** durch Zugabe von Pd/C in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre die Cbz-Schutzgruppen abgespalten und Rezeptor **102** nach Filtration und destillativer Entfernung des Lösemittels in quantitativer Ausbeute erhalten (s. Abbildung 4-61).

Abbildung 4-63 zeigt nochmals zusammenfassend die in Lösung synthetisierten unsymmetrischen Rezeptoren **90** und **91** und die Vergleichsrezeptoren **99** bis **103**.

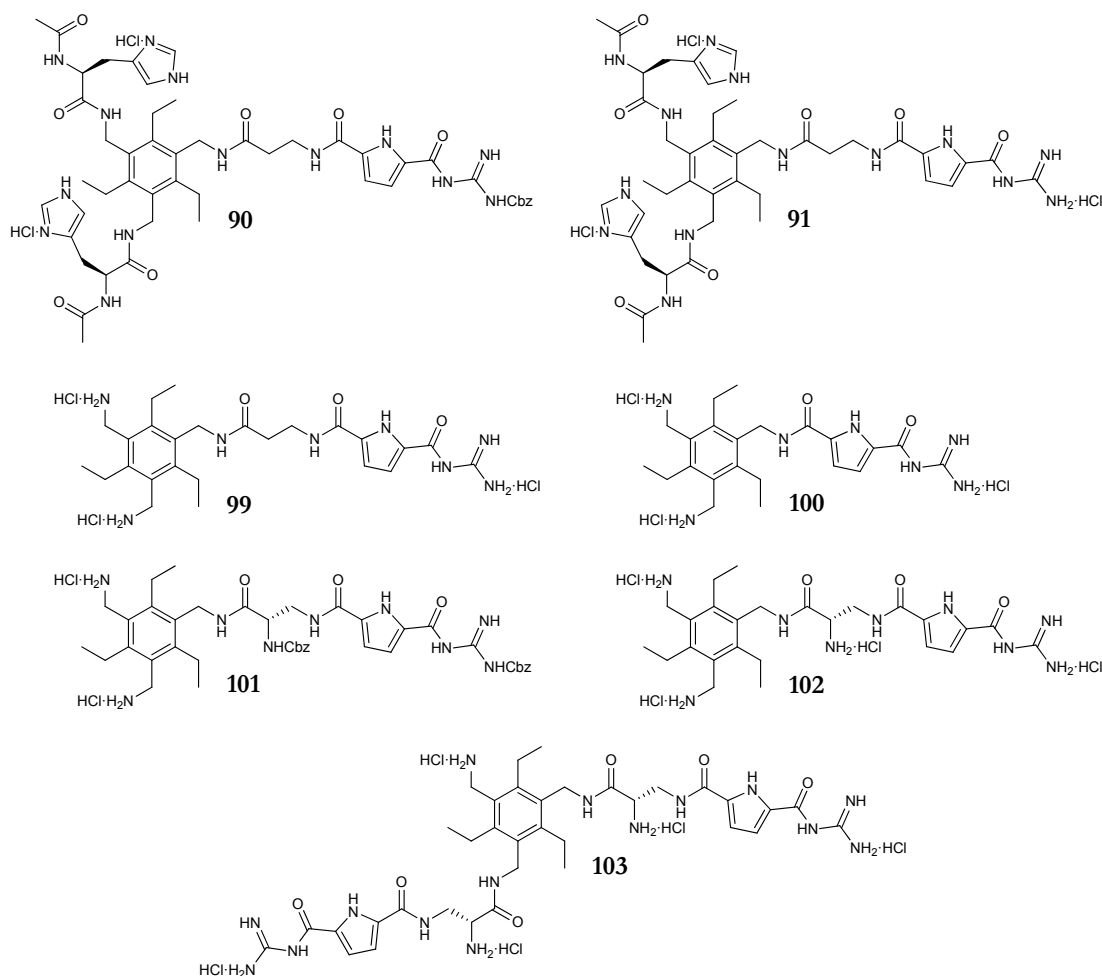


Abbildung 4-63: Strukturen der in Lösung synthetisierten unsymmetrischen Rezeptoren **90** und **91** und die Strukturen der Vergleichsrezeptoren **99**, **100**, **101**, **102** und **103**.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es somit erfolgreich gelungen nach Entwicklung der verschiedenen Synthesestrategie, einschließlich neuer Templatesynthesen der Template **55** und **57** und entsprechenden Syntheseoptimierungen neben den an der Festphase synthetisierten Rezeptoren (**71-73**) auch in Lösung die symmetrischen Rezeptoren (**75**, **80**, **85**, **87**, **89**) und die unsymmetrischen Rezeptoren (**90**, **91**, **99-103**) zu synthetisieren.

Die für die Festphasenpeptidsynthese entwickelte Synthesestrategie konnte trotz des Schwierigkeitsgrades der Synthese aufgrund der verzweigten Struktur und dem möglichen Aggregationsverhalten erfolgreich optimiert und synthetisch umgesetzt werden. Entscheidend für das Gelingen waren die Wahl des Harzes (PEG-Harz), der Kupplungsbedingungen (Mindestkonzentration von $0.18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Mikrowellentechnik: 96°C , 20 W , 20 min ; Verdopplung der Lösemittelmenge bei gleichbleibender Konzentration bei der Kupplung des Tyrosins) und der Kupplungsreagenzien (DIC, Cl-HOBt). Zunächst auftretende Probleme wie Epimerisierung oder moderate Ausbeuten bei der Synthese einiger Rezeptoren in Lösung wurden durch Syntheseoptimierungen oder auch die Entwicklung alternativer Syntheserouten

mit Erfolg gelöst. Abbildung 4-64 zeigt nochmals zusammenfassend alle im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisierten Rezeptoren.

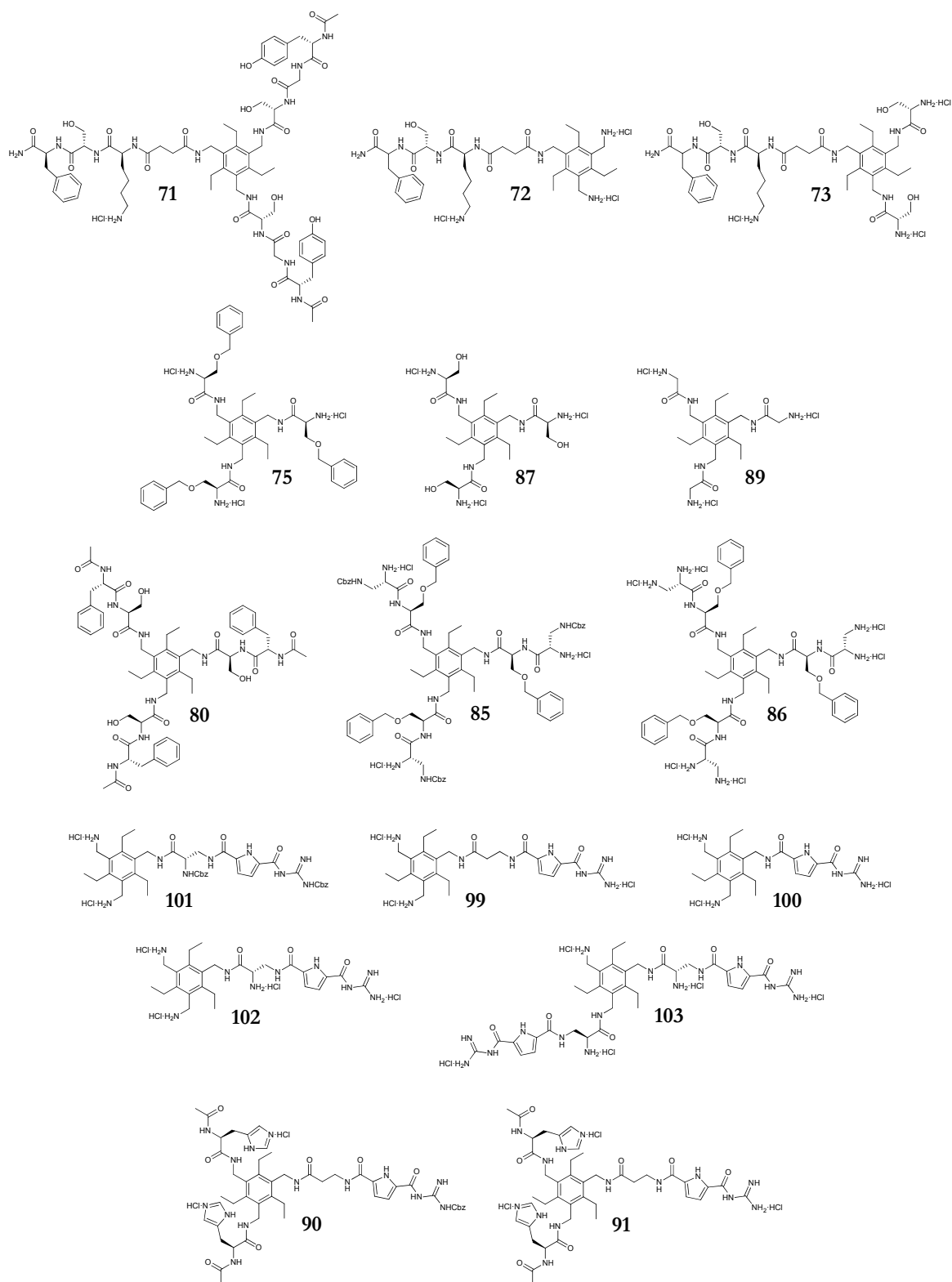


Abbildung 4-64: Strukturen aller synthetisierten Rezeptoren 71-73, 75, 80, 85, 87, 89-91, und 99-103. Die Anordnung der Rezeptoren erfolgt nach ihrer Synthese an der Festphase oder in Lösung und innerhalb dieser Anordnung sind die Strukturen nach ihrer Ähnlichkeit, d. h. nach der Anzahl ihrer Arme bzw. nach Anzahl der Aminosäuren innerhalb der Arme angeordnet. Die Rezeptoren 80 und 85 sind nicht wasserlöslich und können daher nicht auf ihr Potential zur Bindung der ausgewählten Substrate in Wasser hin untersucht werden.

Im folgenden Kapitel werden die Bindungsstudien mit ausgewählten biologischen Substraten zur Einschätzung des Potentials der verschiedenen in Abbildung 4-64 gezeigten symmetrischen und unsymmetrischen Rezeptoren, die in Lösung und an der Festphase synthetisiert wurden, mit Ausnahme der wasserunlöslichen Rezeptoren **80** und **85**, vorgestellt und diskutiert. Als biologische Substrate wurden Polynukleotide, Nukleotide und Zucker ausgewählt.

4.3 Studien mit ausgewählten biologischen Substraten zur Einschätzung des Potentials der Rezeptoren

Die Untersuchung bzw. Quantifizierung der Bindungsstärke von Rezeptor-Substrat-Komplexen kann mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden erfolgen. Voraussetzung hierbei ist, dass sich Rezeptor bzw. Substrat und der Komplex in bestimmten Eigenschaften, wie z. B. ihrer Fluoreszenzintensität im Fall der Fluoreszenzspektroskopie unterscheiden. Zur Untersuchung der ausgewählten Substrate – DNA, Polynukleotide, Nukleotide und Zucker – wurde die Methode der Fluoreszenzspektroskopie ausgewählt. Zusätzlich wurde das Bindungsverhalten der Rezeptoren gegenüber verschiedenen Polynukleotiden mit Hilfe thermischer Denaturierungsexperimente untersucht. Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Methoden und ihre Grundlagen vorgestellt und die Ergebnisse der verschiedenen Studien diskutiert. Alle synthetisierten symmetrischen bzw. unsymmetrischen ein bis dreiarmigen Rezeptoren, mit Ausnahme der wasserunlöslichen Rezeptoren **80** und **85**, wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber ctDNA mittels thermischen Denaturierungsexperimenten untersucht.

Allgemein lässt sich festhalten, dass mit wenigen Ausnahmen, alle Rezeptoren die DNA binden und dadurch die Doppelhelixstruktur stabilisieren. Die Unterschiede in den Bindungseigenschaften korrelieren im Wesentlichen mit dem Ladungszustand der Rezeptoren: je höher die Ladung des Rezeptors ist, desto größer ist die Stabilisierung der DNA. Weiter hat sich herausgestellt, dass die Aminosäure Serin – sowohl in ihrer geschützten Form als Benzylether als auch ungeschützt – direkt an das Triamin gekuppelt im Vergleich mit den analogen Rezeptoren zu einer geringeren DNA-Stabilisierung führt. Die auffälligste Ausnahme unter allen Rezeptoren bildet Rezeptor **71** (s. Abbildung 4-65). Trotz seiner einen positiven Ladung und der direkt am Triamin befindlichen Aminosäure Serin stabilisiert er die DNA verhältnismäßig gut. Dies lässt vermuten, dass neben ionischen Wechselwirkungen weitere, bindende nicht-kovalente Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen.

Die vier besten Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** (s. Abbildung 4-65) wurden in weiteren Denaturierungsexperimenten zusätzlich auf ihr Stabilisierungsvermögen gegenüber verschie-

denen künstlichen Polynukleotiden ($\text{pdA} \times \text{pdT}$, p(dAdT)_2 , $\text{pA} \times \text{pU}$) untersucht. Allgemein wird eine Präferenz für AT-reiche Sequenzen und für die RNA beobachtet. Dies deutet auf eine bevorzugte Bindung der Rezeptoren in sehr schmale Furchen hin, konkret also in die sehr schmale kleine Furche der AT-reichen Sequenzen und die sehr schmale große Furche der RNA.

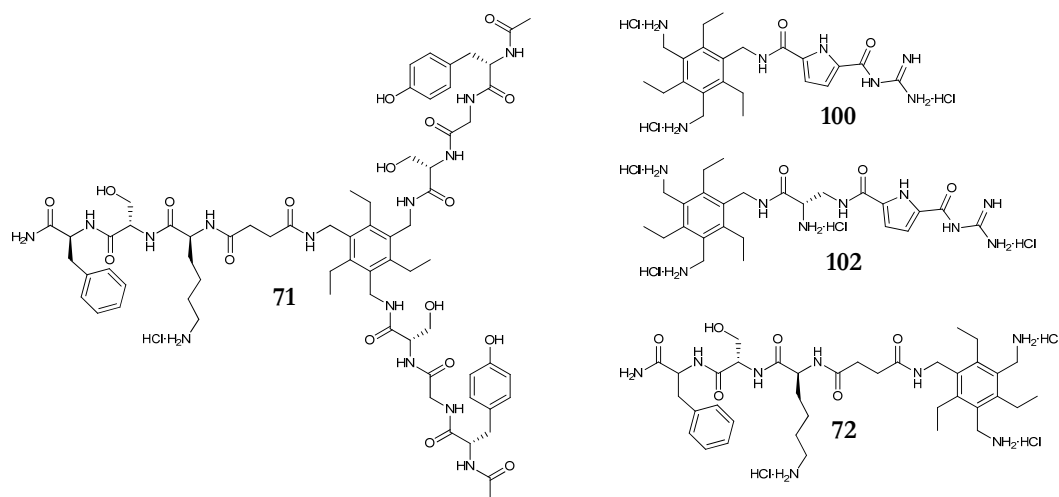


Abbildung 4-65: Strukturen der Rezeptoren **71**, **72**, **100** und **102**.

Für weitere qualitative Bindungsstudien mit Nukleotiden und Zuckern wurden die Rezeptoren **71** und **86** ausgewählt (s. Abbildung 4-66).

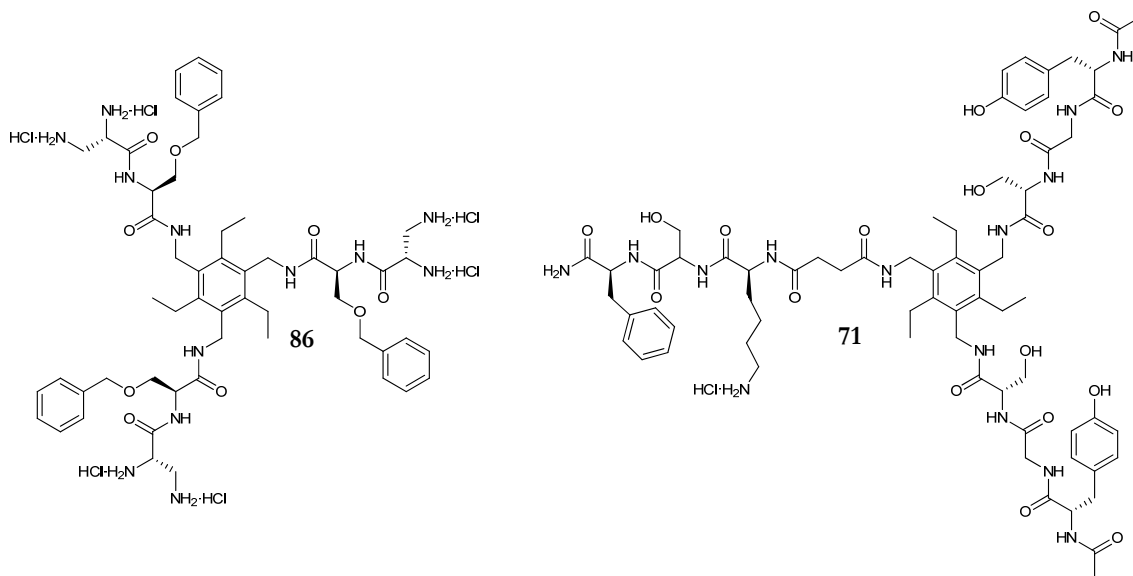


Abbildung 4-66: Strukturen der Rezeptoren **71** und **86**, die für qualitative Bindungsstudien mit Nukleotiden und Zuckern ausgewählt wurden.

Beide Rezeptoren besitzen drei Arme, die jeweils aus drei bzw. zwei Aminosäuren aufgebaut sind, so dass es in beiden Fällen möglich ist, eine das Substrat umschließende Kavität zu bilden. Um unter den 43 ausgewählten Substraten mit einem möglichst einfachen und effizienten

Verfahren die Substrate, die gebunden werden, ausfindig zu machen, wurde ein schnelles, quantitatives Fluoreszenzscreeningverfahren angewendet. Anschließend wurden für die sich aus dem Screening ergebenden Substrate in Fluoreszenztitrationsexperimenten die Bindungsstärken bestimmt. Das Bindungsverhalten des Rezeptors **86** erwies sich als sehr komplex, d. h. es konnte keine eindeutige Stöchiometrie bestimmt werden, so dass auch keine Bindungskonstanten ermittelt werden konnten. Auch unter der Annahme verschiedener möglicher Komplexe zur Berechnung der Bindungskonstanten konnten keine aussagekräftigen Bindungskonstanten mittels des Programms *SpecFit* berechnet werden. Rezeptor **71** hingegen bindet die ausgewählten Substrate in 1:1-Komplexen und komplexiert neben Nukleotiden auch einen Zucker (Glucosamin **143**). Rezeptor **71** bindet Glucosamin in der gleichen Größenordnung wie die bisher effektivsten literaturbekannten Kohlenhydratrezeptoren.

Den Anfang der folgenden Studien machen die Untersuchungen der Rezeptoren mit ctDNA mittels thermischer Denaturierungsexperimente.

4.3.1 Thermische DNA/RNA Denaturierung

4.3.1.1 Grundlagen der thermischen Denaturierung

Die Stabilität von sekundären DNA- oder RNA-Strukturen lässt sich mit Hilfe von thermischen Denaturierungsexperimenten bestimmen.¹⁵⁹ Beim Erhitzen einer DNA- bzw. Polynukleotid-Lösung findet der Prozess der Denaturierung, auch Schmelzen* genannt, statt. Dabei dissoziiert der Polynukleotid-Doppelstrang in Abhängigkeit der Temperatur in seine zwei Einzelstränge. Da die UV-Absorption der Doppelstränge niedriger ist als die Absorption derselben molaren Menge von Nukleobasen bzw. der DNA-Einzelstränge, lässt sich der Prozess der Denaturierung mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgen. Nach Dissoziation der Doppelstränge in ihre Einzelstränge erhöht sich die UV-Absorption bei 260 nm um etwa 15-20 %.¹⁵⁹ Ursache für diesen hyperchromen Effekt sind die Wechselwirkungen der π -Systeme der gestapelten Basenpaare. Abbildung 4-67 links zeigt das Diagramm einer typischen Schmelzkurve, bei dem die gemessene Absorption bei 260 nm gegen die Temperatur der erhitzten Polynukleotid-Lösung aufgetragen wird. Da der Dissoziationsprozess der Doppelstränge kooperativ ist, weist die Schmelzkurve einen charakteristischen sigmoidalen Verlauf auf. Der Punkt mit der größten Steigung ist der Wendepunkt, der als Schmelzpunkt bezeichnet wird. Die Schmelztemperatur T_m , auch Übergangstemperatur genannt, ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte aller Doppelstränge dissoziiert vorliegen.

* Der Begriff Schmelzen bezieht sich hier nicht auf die Änderung eines Aggregatzustands, sondern nur auf die Dissoziation der zwei Stränge der DNA-Doppelhelix.

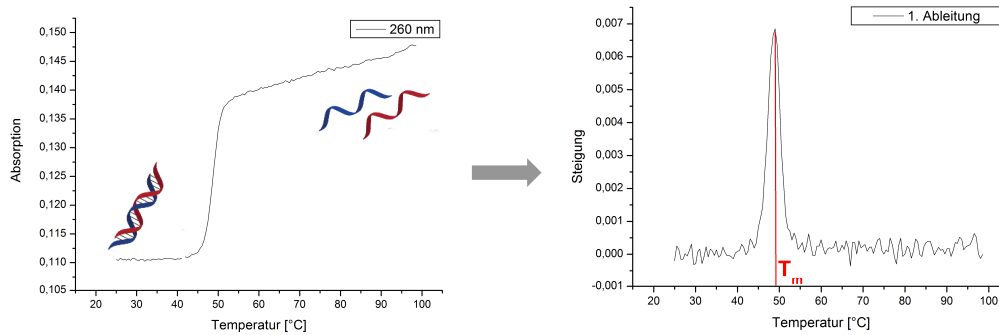


Abbildung 4-67: Links: Bei 260 nm aufgenommene Schmelzkurve eines thermischen Denaturierungsexperiments. Rechts: Berechnung der ersten Ableitung der Schmelzkurve zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m .

Die Lage des Schmelzpunkts und damit die Stabilität des Polynukleotid-Doppelstranges ist sowohl von der Sequenz und Art der Basenpaare als auch von Ionenstärke und pH-Wert des Lösemittels abhängig. Somit besitzen z. B. GC-reiche Polynukleotid-Sequenzen einen vergleichsweise höheren Schmelzpunkt, sind also stabiler. Die Schmelztemperatur T_m kann einmal mathematisch durch Bildung der ersten Ableitung der Schmelzkurve und Auftragung der Steigung über der Temperatur bestimmt werden (s. Abbildung 4-67 rechts) oder graphisch mit der Methode der sich schneidenden Asymptoten. Hierbei werden zwei Geraden auf den eben verlaufenden Bereichen der Schmelzkurve eingezeichnet, gefolgt von einer dritten Gerade, die mit möglichst vielen Punkten auf dem steilen Anstieg der Kurve liegt. Der Mittelpunkt zwischen den zwei sich ergebenden Schnittpunkten beschreibt schließlich den Wendepunkt bzw. die gesuchte Schmelztemperatur T_m . Moleküle, die über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Doppelhelix binden, können durch diese Interaktion die Doppelhelix stabilisieren oder destabilisieren. Dies führt zu einer Zu- bzw. Abnahme der Schmelztemperatur im Vergleich zur Schmelztemperatur des reinen Polynukleotids. Somit kann durch die Bestimmung von ΔT_m ein stabilisierender oder destabilisierender Effekt eines Rezeptors nachgewiesen werden. Zusätzlich lässt sich anhand der Größe von ΔT_m die jeweilige Bindungsaffinitäten der Rezeptoren abschätzen. In der Regel korreliert eine hohe thermische Stabilisierung mit einer hohen Bindungskonstante.

Um die Fähigkeit, ausgewählter Rezeptoren mit DNA zu wechselwirken, zu untersuchen, steht eine Auswahl an synthetischen und natürlichen doppelsträngigen Polynukleotiden zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Messungen und Bindungsstudien die natürliche ctDNA (*calf thymus* DNA) und die synthetischen Polynukleotide $\text{pdA} \times \text{pdT}$, $\text{pdG} \times \text{pdC}$, p(dAdT)_2 , p(dGdC)_2 , und $\text{pA} \times \text{pU}$ verwendet. Die Schreibweisen der verschiedenen Polynukleotide sagen aus, ob es sich um homopolymere (z. B. $\text{pdA} \times \text{pdT}$) oder alternierende (z. B. p(dAdT)_2) Sequenzen handelt und ob die Nukleotide eine Desoxyribose (gekennzeichnet durch „d“ z. B. $\text{pdG} \times \text{pdC}$ oder p(dGdC)_2) oder eine Ribose (z. B. $\text{pA} \times \text{pU}$) besitzen (s. Abbildung 4-68).

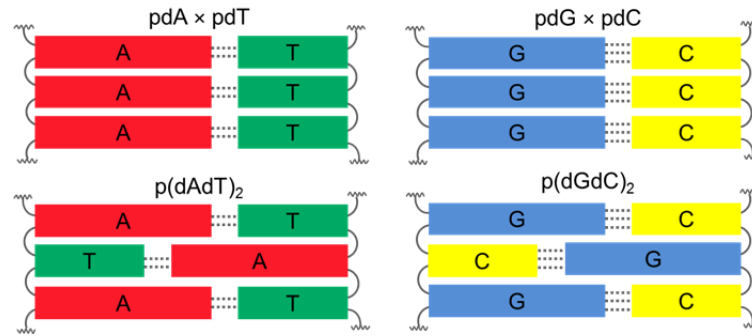


Abbildung 4-68: Illustration der synthetischen homopolymeren (oben) und alternierenden (unten) Nukleinsäuren.

Die verschiedenen Polynukleotide weisen unterschiedliche charakteristische Eigenschaften in Bezug auf ihre sekundäre Struktur auf (s. Tabelle 4-4).¹⁶⁰

PN	Helix	Kleine Furche	Große Furche
ctDNA	B	eher schmal	eher breit
p(dAdT) ₂	B	schmal, tief, elektronegatives Thymin O2, Adenin N2	breit, flach
pdA × pdT	B*	Sehr tief, sehr schmal, elektronegatives Thymin O2, Adenin N2	breit, flach
p(dGdC) ₂	B	Flach, elektropositives Guanin NH ₂	eher schmal
pdG × pdC	A	Breit, flach, elektropositives Guanin NH ₂	schmal
pA × pU	A	breit	schmal

Tabelle 4-4: Charakteristische Eigenschaften der Helixstruktur der untersuchten Polynukleotide und der Struktur der kleinen und der großen Furche.¹⁶⁰

Durch Denaturierungsexperimente mit einem potentiellen Rezeptor lassen sich die einzelnen ΔT_m -Werte und damit ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Rezeptor und Polynukleotid bestimmen. Beim Vergleich der einzelnen ΔT_m -Werte können Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen des Rezeptors bzw. die Bereiche einer DNA-Doppelhelix, mit denen die Wechselwirkungen stattfinden, geschlossen werden. Je nachdem, welche Polynukleotide bevorzugt gebunden werden, kann daraus möglicherweise gefolgert werden, ob der Rezeptor z. B. eher an breite oder schmale Furchen oder elektropositive bzw. elektronegative Bereich der Basen bindet.

4.3.1.2 Durchführung der thermischen Denaturierungsexperimente

Alle verwendeten ds-Polynukleotide wurden kommerziell erworben (*Sigma-Aldrich*) und ohne weitere Behandlung – mit Ausnahme der ctDNA – verwendet. Die natürlich vorkommende ctDNA weist laut Zulieferer in unbehandelter Form eine Länge von etwa 20000 Basenpaaren auf. Die synthetischen homopolymeren (pdA × pdT, pA × pU, pdG × pdC, pG × pC) bzw. alternierenden heteropolymeren (p(dAdT)₂, p(dGdC)₂) Polynukleotide besitzen eine durchschnittliche Länge von 8000-9000 Basenpaaren.

Die Stammlösungen der Polynukleotide wurden in Konzentrationen von etwa 10^{-2} bis $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mit 0.05 molarem Cacodylat-Puffer bei pH 7 angesetzt. Die exakten

Konzentrationen der Polynukleotid-Lösungen wurden mittels UV-Messung bestimmt und beziehen sich auf die Anzahl der Phosphatgruppen des Polynukleotids. Die vom Hersteller erworbene ctDNA wurde ebenfalls in Cacodylat-Puffer (0.05 M, pH 7) gelöst und die erhaltene Lösung vor dem Gebrauch mit Ultraschall (8 x 4 s) behandelt und filtriert, um die langen Stränge in kleine Fragmente aufzubrechen.

Für die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen Stammlösungen wurden jeweils zwei Titrations mit je 5 Messpunkten bei den in Tabelle 4-5 angegebenen entsprechenden Absorptionsmaxima durchgeführt.^{161,162} Mit Hilfe des ebenfalls in Tabelle 4-5 angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten ε und dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz lässt sich die jeweilige exakte Konzentration berechnen. Als Konzentration der Stammlösungen wurde der Mittelwert aus den berechneten Werten der jeweils zwei Titrations verwendet.*

Nukleinsäure	pdA × pdT	p(dAdT) ₂	pdG × pdC	p(dGdC) ₂	pA × pU	pG × pC	ctDNA
ε [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	6000	6600	7400	8400	6000	7400	6600
λ_{\max} [nm]	260	262	253	254	260	253	260

Tabelle 4-5: Molare Extinktionskoeffizienten ε am UV-Absorptionsmaximum (λ_{\max}) der verschiedenen Nukleinsäuren.^{161,162}

Alle Rezeptoren **71-73, 75, 87, 89, 90, 91**, und **99-103** wurden bei neutralem pH vermessen, während die Rezeptoren **90, 91, 99, 100, 102** und **103** zusätzlich bei pH 5 vermessen wurden um ihr Bindungsvermögen bei vollständiger Protonierung vergleichend beurteilen zu können (s. Abbildung 4-69). Betrachtet man die pK_s-Werte der unterschiedlichen Amine in den Verbindungen wird klar, dass nicht alle Rezeptoren bei pH 7 vollständig protoniert vorliegen. Das Amin der Lysin-Seitenkette (pK_s = 10.8)³, die Amine in α -Position der Aminosäuren (pK_s \approx 9.1-9.9)³ und die Benzylamine (pK_s \approx 9-10)³ liegen bei neutralem pH vollständig protoniert vor. Hingegen sind die Histidin-Seitenketten (pK_s = 6.04)³ und die Guanidiniocarbonylpyrrol-Reste (pK_s \approx 7.0)¹⁶³ nur teilweise protoniert. Mit Hilfe der *Henderson-Hasselbach* Gleichung und den gegebenen pK_s-Werten lässt sich der prozentuale Anteil der Ladung in den einzelnen Verbindungen abschätzen. Die Rezeptoren **71, 72, 73, 75, 86, 87** und **89** sind bei pH 7 vollständig protoniert während die Guanidiniogruppen von **102, 100, 99, 103** und **91** zu 50 % und die Histidin-Seitenketten von **90** und **91** zu 10 % protoniert vorliegen. Somit besitzt **102** bei pH 7 durchschnittlich 3.5 positive Ladungen, **100** und **99** 2.5 positive Ladungen, **103** 4.0 positive Ladungen, **91** nur 0.7 und **90** nur 0.2 positive Ladungen. In Lösungen mit einem pH von 5 sind die Guanidiniogruppen zu 100 % protoniert und somit sind **102, 100, 99** und **103** bei pH 5 vollständig protoniert, besitzen also ihre maximal mögliche Anzahl an positiven Ladungen. Die Histidin-Seitenketten von **91** und **90** sind bei pH 5 zu 92 %

* Zur detaillierteren allgemeinen Vorgehensweise zur Durchführung der thermischen Denaturierung siehe Literaturstelle 168.

protoniert, so dass **91** durchschnittlich 2.84 (maximal möglich wären 3) und **90** 1,84 (maximal möglich wären 2) positive Ladungen besitzen. Aufgrund der Durchführung der Denaturierungsexperimente für alle Rezeptoren bei pH 7 und zum Teil bei pH 5 sollte sich der Einfluss der Anzahl der durchschnittlichen positiven Ladung der einzelnen Rezeptoren auf ihr Bindungsverhalten untersuchen lassen.

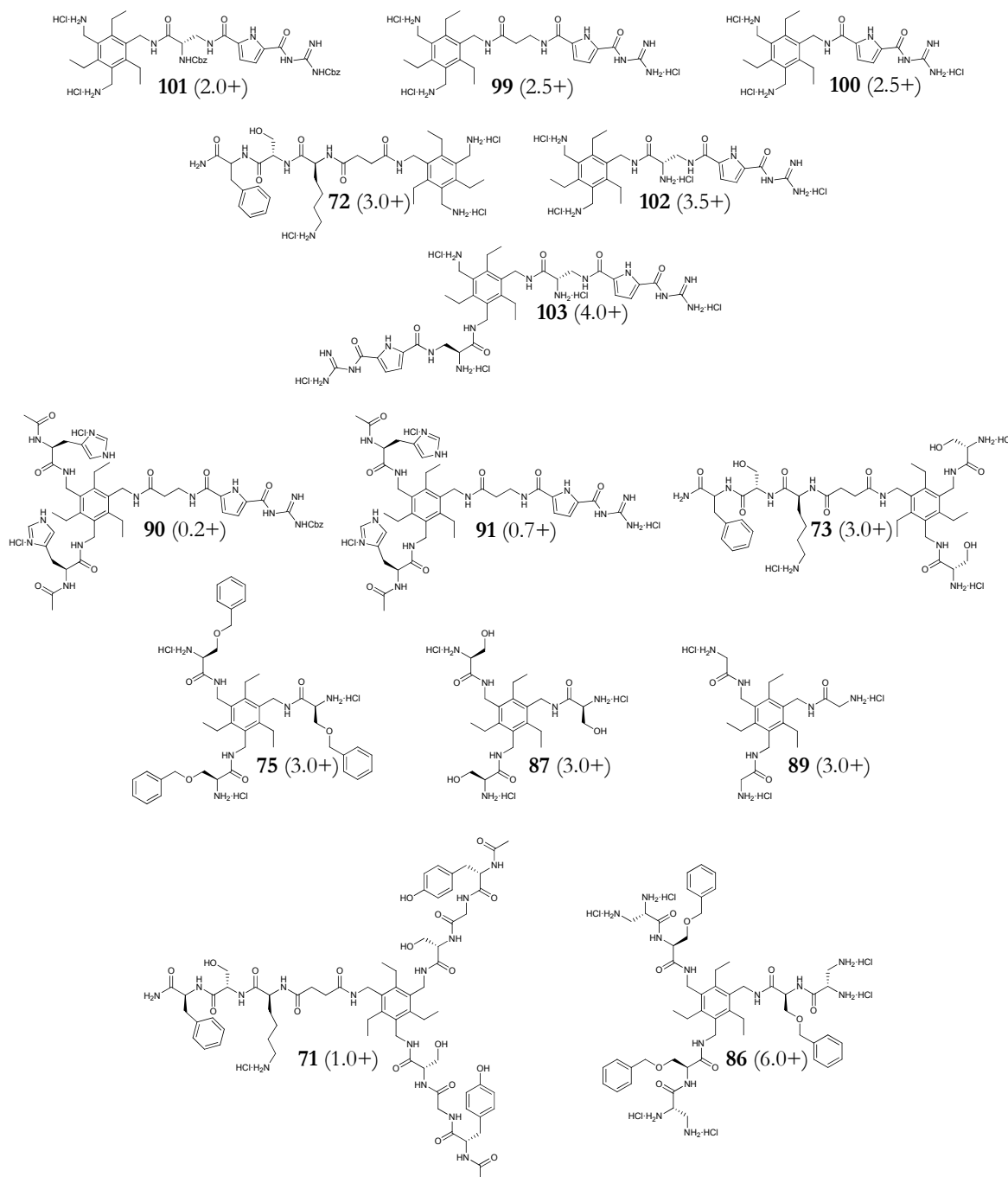


Abbildung 4-69: Strukturen der Rezeptoren **71-73**, **75**, **87**, **89**, **90**, **91** und **99-103**, die in den Denaturierungsexperimenten mit den verschiedenen Nukleinsäuren untersucht wurden. Die Rezeptoren sind nach der Anzahl ihrer Arme und nach ihrem symmetrischen bzw. unsymmetrischen Aufbau geordnet. Die Angabe in Klammern bezieht sich auf die Anzahl der Ladungen bei pH 7. Eine nochmalige Abbildung aller vermessenen Rezeptoren zum Ausklappen befindet sich am Ende der Arbeit.

Vor der Durchführung der thermischen Denaturierungsexperimente zur Bestimmung von ΔT_m wurden zunächst die Löslichkeit und die Stabilität der ausgewählten Rezeptoren unter den Messbedingungen überprüft. Alle Rezeptoren sind in Wasser in einer Konzentration von 4 mM löslich. Daher wurden alle Stammlösungen der Rezeptoren in Wasser mit einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ angesetzt. Während des Denaturierungsexperiments werden die Proben in schrittweise mit $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ pro Minute von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $99 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Die in Abbildung 4-69 gezeigten Rezeptoren **71-73**, **75**, **87**, **89**, **90**, **91**, und **99-103**, wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Cacodylat-Puffer (0.01 M) bei pH 5 bzw. pH 7 in einer Küvette unter den gleichen Bedingungen erhitzt, unter denen auch die nachfolgenden Denaturierungsexperimente durchgeführt wurden, um ihre Stabilität zu überprüfen. Um sowohl die Beständigkeit gegenüber dem Erhitzen als auch die Stabilität in Lösung über längere Zeit zu überprüfen, wurden die UV-Spektren der einzelnen Rezeptoren bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ im Bereich von 220-400 nm vor dem Erhitzen, nach dem Erhitzen und nach weiteren 24 Stunden miteinander verglichen. Ebenso wurde die UV-Absorption der Rezeptoren bei 260 nm bei jeweils 25, 45, 65, 85 und $95 \text{ }^\circ\text{C}$ auf ihre Konstanz hin überprüft, da eventuelle Änderungen der UV-Absorption des Rezeptors während dem Erhitzen bei der Interpretation der Schmelzkurven mit berücksichtigt werden mussten. Abbildung 4-70 zeigt beispielhaft den Vergleich der UV-Spektren des Rezeptors **103**, die vor dem Erhitzen, nach dem Erhitzen und weitere 24 Stunden später jeweils bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen wurden, ebenso wie die Absorption der Verbindung bei 260 nm, die bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde.

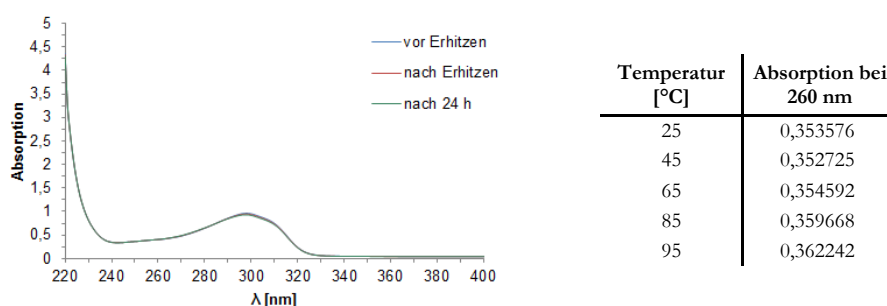


Abbildung 4-70: Stabilitätstest des Rezeptors **103** unter den Bedingungen der Denaturierungsexperimente. **Links:** UV-Spektren des Rezeptors **103** ($4.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7, 0.01 M Cacodylat-Puffer) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ im Bereich von 220-400 nm vor Erhitzen, nach Erhitzen und nach weiteren 24 h. **Rechts:** Absorption des Rezeptors **103** bei 260 nm gemessenen bei verschiedenen Temperaturen.

Die Vergleiche der UV-Spektren der weiteren Rezeptoren sind im Anhang abgebildet (s. Kapitel 7.1.1). Die UV-Spektren und Absorptionswerte aller Rezeptoren sind, unabhängig unter welchen Bedingungen sie gemessen wurden, im Rahmen des Fehlers des Spektrometers unverändert. Die Stabilitätstests lassen den Schluss zu, dass die Rezeptoren sowohl in Lösung bei pH 7 bzw. pH 5 als auch über einen gewissen Zeitraum und gegenüber Temperatur stabil

und sich damit für die geplanten thermischen Denaturierungsexperimente mit den Polynukleotiden eignen.

Die Denaturierungsexperimente wurden in Cacodylat-Puffer (0.01 M) bei pH 5 und/oder pH 7 durchgeführt. Zur Herstellung der ctDNA-Lösungen für die thermischen Messungen wurde zunächst in einer 1 ml Küvette eine ctDNA-Lösung mit der ungefähren Konzentration von $1.5\text{--}2.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ angesetzt, was einer ungefähren Absorption von etwa 0.15 entspricht. Um die exakte Konzentration der Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm, der maximalen Absorption von ctDNA, gemessen und mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ die Konzentration berechnet. Anschließend wurden die thermischen Messungen durchgeführt, indem in Bezug auf die Phosphatgruppen der DNA jeweils 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalente zugegeben wurden und zusätzlich Proben mit reiner DNA-Lösung vorbereitet und parallel vermessen wurden. Die vorbereiteten Proben wurden langsam von 25 °C auf 99 °C bei einer Heizrate von 0.5 °C pro Minute erhitzt. Nach je 0.5 min Inkubationszeit wurde nach jedem 0.5 °C-Temperaturschritt die Absorption bei 260 nm gemessen. Abbildung 4-71 zeigt beispielhaft die gemessenen Schmelzkurven von ctDNA und den zugegebenen Äquivalenten des Rezeptors **102**.

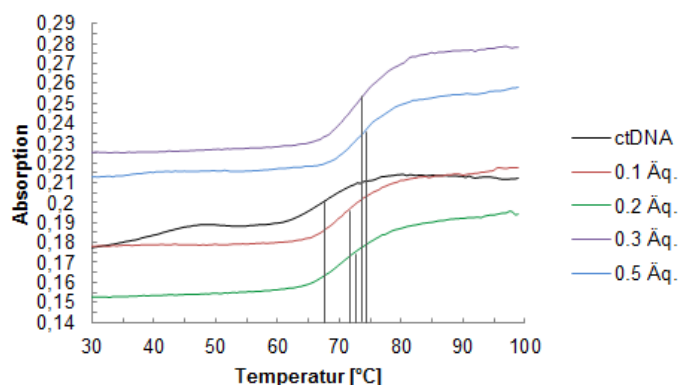


Abbildung 4-71: Schmelzkurven der ctDNA ($1.5\text{--}2.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) bei pH 7 unter Zugabe verschiedener Äquivalente des Rezeptors **102** (Absorption gemessen bei 260 nm, Cacodylat-Puffer 0.01 M)

Jede Messung wurde zweifach mit jeweils neu angesetzten Proben durchgeführt, mit Hilfe der zwei zuvor beschriebenen Methoden die Schmelzpunkte bestimmt und der Mittelwert der berechneten Schmelzpunkte aus den zwei Messungen gebildet. Die vollständigen Ergebnisse der thermischen Denaturierungsexperimente der Rezeptoren **71-73**, **75**, **87**, **89**, **90**, **91**, und **99-103** (s. Abbildung 4-69) mit ctDNA bei pH 5 und pH 7 sind in Tabelle 4-6 aufgelistet und werden im Folgenden detaillierter diskutiert. Am Ende dieser Arbeit befindet sich unterstützend zur Verständlichkeit des folgenden Abschnitts nochmals eine Abbildung der Rezeptoren zum Ausklappen.

pH 7

Nr.	Rezeptor	Äquivalente	ΔT_m [°C]
1	91 (0.7+)	0.1	-0.28
		0.2	-0.06
		0.3	-0.31
		0.5	0.19
2	87 (3.0+)	0.1	-0.69
		0.2	0.91
		0.3	0.50
		0.5	0.60
3	75 (3.0+)	0.1	-0.59
		0.2	-0.34
		0.3	-0.56
		0.5	0.25
4	90 (0.2+)	0.1	-0.98
		0.2	0.02
		0.5	0.00
		0.5	1.02
5	101 (2.0+)	0.1	1.05
		0.2	2.26
		0.3	1.64
		0.5	2.67
6	86 (6.0+)	0.1	1.95
		0.2	2.84
		0.3	2.47
		0.5	3.67
7	89 (3.0+)	0.1	1.68
		0.2	2.41
		0.3	2.95
		0.5	4.48

Nr.	Rezeptor	Äquivalente	ΔT_m [°C]
8	73 (3.0+)	0.1	-0.21
		0.2	1.43
		0.3	1.87
		0.5	4.25
9	103 (4.0+)	0.1	1.71
		0.2	3.42
		0.3	3.29
		0.5	4.75
10	99 (2.5+)	0.1	1.46
		0.2	2.59
		0.3	3.63
		0.5	4.76
11	71 (1.0+)	0.1	1.37
		0.2	1.41
		0.3	1.70
		0.5	4.83
12	72 (3.0+)	0.1	1.46
		0.2	2.85
		0.3	2.70
		0.5	5.76
13	100 (2.5+)	0.1	1.20
		0.2	3.50
		0.3	2.71
		0.5	6.44
14	102 (3.5+)	0.1	3.09
		0.2	3.99
		0.5	5.70
		0.5	6.67

pH 5

Nr.	Rezeptor	Äquivalente	ΔT_m [°C]
15	90 (1.8+)	0.1	0.49
		0.2	0.86
		0.3	1.39
		0.5	2.68
16	91 (2.8+)	0.1	5.06
		0.2	7.27
		0.3	9.06
		0.5	10.36
17	100 (3.0+)	0.1	10.30
		0.2	14.34
		0.3	14.22
		0.5	14.83

Nr.	Rezeptor	Äquivalente	ΔT_m [°C]
18	99 (3.0+)	0.1	7.78
		0.2	12.60
		0.3	13.65
		0.5	16.47
19	102 (4.0+)	0.1	16.06
		0.2	16.58
		0.3	10.71*
		0.5	6.52*
20	103 (5.0+)	0.1	*
		0.2	*
		0.3	*
		0.5	*

Tabelle 4-6: Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der ctDNA bei Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der zu vermessenden Rezeptoren. Die Tabelleneinträge sind aufsteigend nach der Größe der Stabilisierung sortiert. In Klammern ist die Anzahl der Ladungen bei dem entsprechenden pH angegeben. (T_m (ctDNA, pH 7) = 67.6, T_m (ctDNA, pH 5) = 59.5, * Niederschlag)

Allgemein wird beobachtet, dass mit wenigen Ausnahmen die Rezeptoren die Doppelhelix-Struktur stabilisieren und damit in der Lage sind an die DNA-Helix zu binden.

Bis auf die Rezeptoren **91** (Nr. 1), **87**(Nr. 2), **75** (Nr. 3), und **90** (Nr. 4) steigern bei neutralem pH alle Rezeptoren die thermische Stabilität der ctDNA. Sie binden also bevorzugt doppelsträngige DNA-Strukturen anstelle von einsträngiger entwundener DNA. Bis auf einige Ausnahmen, die im Folgenden noch diskutiert werden, binden die Rezeptoren stärker je höher die Ladung des Moleküls ist. Die Ausnahmen von dieser Tendenz bilden **86** mit sechs positiven

Ladungen und **71** mit nur einer positiven Ladung, die beide die DNA stabilisieren, ebenso wie die beiden Rezeptoren **87** und **75**, die beide trotz drei positiver Ladungen die DNA nicht binden. Die beiden anderen Verbindungen, die ebenfalls zu keiner Stabilisierung der DNA führen, sind **91** mit durchschnittlich 0.7 positiven Ladungen und **90** mit durchschnittlich 0.2 positiven Ladungen. Die Vermutung liegt nahe, dass der Mangel an Stabilisierung in diesen beiden Fällen an der geringen positiven Ladung der beiden Moleküle liegt, insbesondere da beide Rezeptoren bei pH 5 zu einer Stabilisierung der ctDNA führen (Nr. 15 und 16). Die Rezeptoren **87** und **75** besitzen im Gegensatz jeweils drei positive Ladungen und daher wie auch andere Rezeptoren mit drei positiven Ladungen, wie beispielsweise Rezeptor **89** (Nr. 7), das Potential die DNA zu stabilisieren. Der Strukturvergleich der Rezeptoren **87**, **75** und **89** zeigt, dass alle über drei positive Ladungen verfügen und sich nur in der Seitenkette der Aminosäure unterscheiden. Allerdings ist nur Rezeptor **89** in der Lage die DNA zu stabilisieren (s. Abbildung 4-72 und Abbildung 4-69 bzw. Faltblatt am Ende der Arbeit).

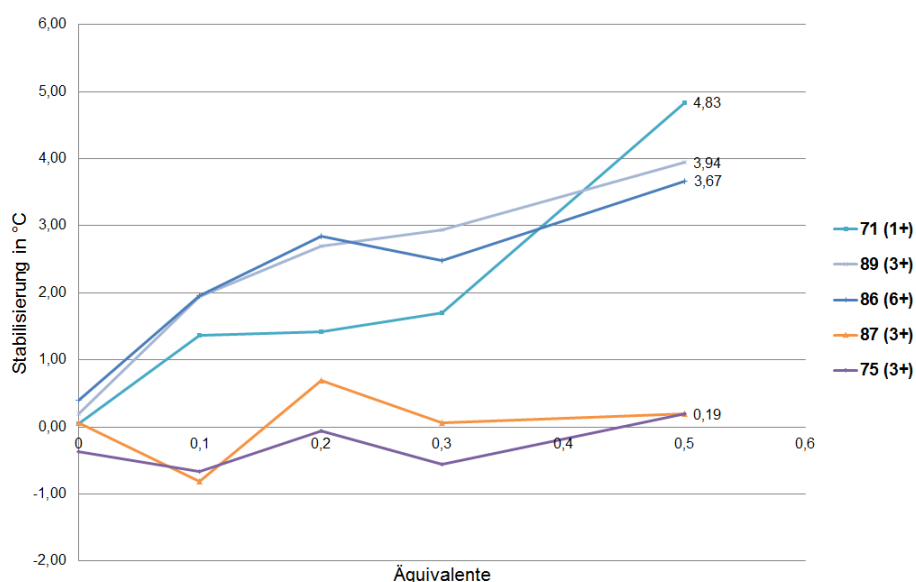


Abbildung 4-72: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der ctDNA in Abhängigkeit von der Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der Rezeptoren **71**, **75**, **86**, **87** und **89** bei pH 7.

Der Vergleich der Struktur der drei Verbindungen und ihrem Potential ctDNA zu stabilisieren lässt den Schluss zu, dass vermutlich sowohl die ungeschützte als auch die Benzylgeschützte Seitenkette des Serins, welches direkt an das Triamin gekuppelt ist, eine Destabilisierung verursacht, die die ionische Bindung der drei Ammonium-Gruppen kompensiert bzw. die Bindung der Moleküle im Generellen verhindert. Denkbar ist auch, dass die Rezeptoren durch die Aminosäure Serin eventuell eine ungünstige Konformation einnehmen, so dass die Passform des entsprechenden Rezeptors nicht mehr mit der Form der DNA-Furche kompatibel ist und damit keine bindenden Wechselwirkungen ausgebildet

werden können. Die Vermutung, dass die Aminosäure Serin dafür verantwortlich ist, dass die Rezeptoren **75** und **87** nicht an die DNA binden, wird zusätzlich durch Rezeptor **86** (Nr. 6) bestätigt, dessen Arme aus zwei Aminosäuren aufgebaut sind und auch über ein Benzyl-geschütztes Serin mit dem Templat verknüpft sind. Mit sechs positiven Ladungen besitzt Rezeptor **86** von allen vermessen Verbindungen die meisten Ladungen, führt aber dennoch nur zu einer Stabilisierung der DNA von 3,67 °C (0.5 Äq.). Dies liegt in etwa in der Größenordnung der Stabilisierung der dreifach geladenen Rezeptoren wie **73** (4.25 °C, 0.5 Äq., Nr. 8) und **89** (4.48 °C, 0.5 Äq., Nr. 7). Ursache hierfür könnten die für die Bindung an die DNA ungünstigen Benzyl-geschützten Seitenketten des Serins sein, so dass von den sechs positiven Ladungen effektiv nur drei Ladungen für Wechselwirkungen mit der DNA genutzt werden können. Rezeptor **71** hingegen ist unter den bindenden Rezeptoren der einzige mit nur einer positiven Ladung, verursacht aber eine verhältnismäßig hohe Stabilisierung von 4.83 °C bei Zugabe von 0.5 Äq. (Nr. 11). Dies lässt vermuten, dass die Bindung zwischen Rezeptor und DNA nicht hauptsächlich auf ionischen Wechselwirkungen beruht sondern vermutlich durch Wasserstoff-Brückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird. Der Vergleich von **71** mit den synthetischen Vorstufen **72** und **73** bestätigt diese Vermutung ebenso wie die Annahme, dass Serin, wenn direkt mit dem Triamin verknüpft, sich ungünstig auf die Bindung an die DNA auswirkt (s. Abbildung 4-73). Die Rezeptoren **72** und **73** besitzen beide drei positive Ladungen und unterscheiden sich nur durch die zusätzlichen an das Triamin gekuppelten Serine bei Rezeptor **73**. Trotz der gleichen Anzahl an Ladungen stabilisiert **72** mit 5.76 °C (bei 0.5 Äq., Nr. 12) die DNA eindeutig stärker als **73** mit 4.25 °C (bei 0.5 Äq., Nr. 8).

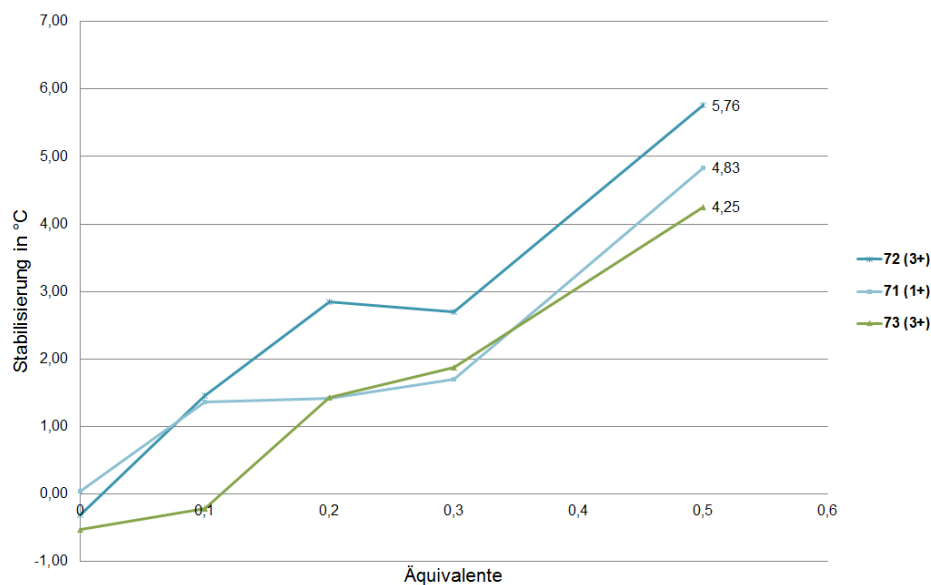


Abbildung 4-73: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der ctDNA in Abhängigkeit von der Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der Rezeptoren **71**, **72** und **73** bei pH 7.

Da der Unterschied zwischen beiden Verbindungen wie zuvor erwähnt die beiden Serine sind, bestätigen diese Stabilisierungswerte zusätzlich den negativen Einfluss der Serine in dieser Position auf die Stabilisierung der DNA. Rezeptor **71** stabilisiert die DNA in einem ähnlichem Maß wie Rezeptor **73** obwohl er anstelle von drei nur eine positive Ladung aufweist. Da **71** neben der einfachen positiven Ladung zusätzlich die offensichtlich ungünstigen Serine aufweist, scheint dennoch die Struktur des Rezeptors eine geeignete Passform zu bilden und besonders günstige Wechselwirkungen mit der DNA-Doppelhelix ausbilden zu können.

Vergleicht man die Verbindungen **102**, **100**, **99**, **101** und **72**, deren Strukturen nur einen Arm am Triamin aufweisen, gilt auch hier die Tendenz: je höher das Molekül geladen ist, desto größer ist die Stabilisierung. Rezeptor **103** mit vier positiven Ladungen bildet allerdings eine Ausnahme, da **103** (4.75 °C bei 0.5 Äq., Nr. 9) zwar die höchste Ladung besitzt, aber eine Stabilisierung ähnlich der Rezeptor **99** (4.76 °C bei 0.5 Äq., Nr. 10) mit 2.5 Ladungen erzielt (s. Abbildung 4-74).

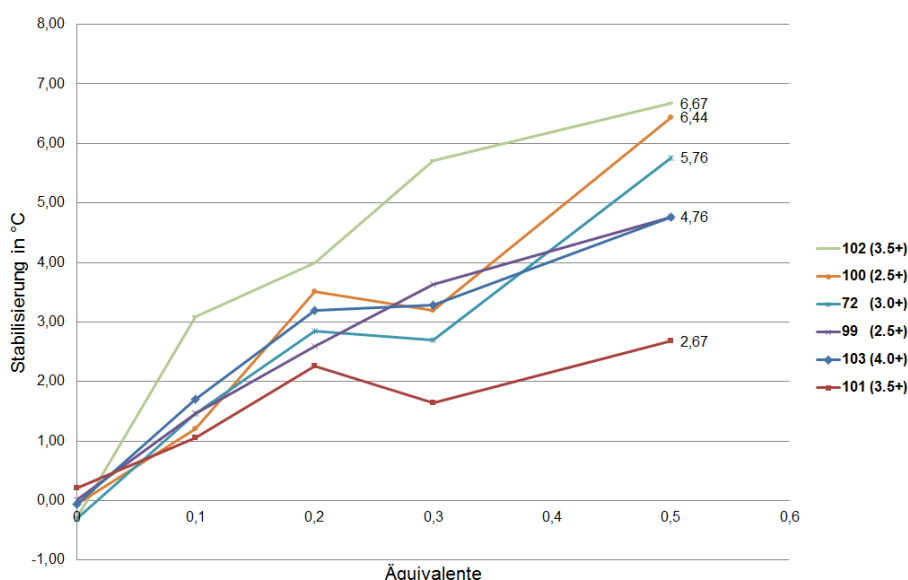


Abbildung 4-74: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der ctDNA in Abhängigkeit von der Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der Rezeptoren **72** (3 Ladungen), **99** (2.5 Ladungen), **101** (2 Ladungen), **100** (2.5 Ladungen), **102** (3.5 Ladungen) und **103** (4 Ladungen) bei pH 7.

Von allen vermessenen Rezeptoren verursacht Rezeptor **102** (6.67 °C bei 0.5 Äq., Nr. 14) mit 3.5 positiven Ladungen bei pH 7 die größte Stabilisierung der ctDNA. Rezeptor **103** mit 4 positiven stabilisiert die DNA bei pH 7 um etwa 2 °C weniger. Bei pH 5 hingegen besitzt **103** 5 positive Ladungen und schon bei Zugabe von 0.1 Äquivalenten des Rezeptors zur DNA fällt während dem Erhitzen das DNA-Rezeptor-Addukt aus. Dies spricht für eine sehr starke Bindung bzw. für die Bildung unlöslicher Agglomerate. Rezeptor **102** mit 4 positiven Ladungen bei pH 5 sorgt ab der Zugabe von 0.1 und 0.2 Äquivalenten für eine außerordentlich starke Stabilisierung von über 16 °C (Nr. 19) und es kommt erst am der Zugabe von 0.3 Äquivalenten

zu einem sichtbaren Niederschlag (s. Abbildung 4-75). Die Rezeptoren **100** und **99** besitzen bei pH 7 die gleich Anzahl von Ladungen (2.5), aber Rezeptor **100** scheint die ctDNA etwas besser zu stabilisieren insbesondere beim Vergleich der Stabilisierung bei 0.5 Äquivalenten (**100**: 6.44 °C, Nr. 13; **99**: 4.76 °C, Nr. 10). Dies könnte darauf hinweisen, dass der kürzere Rezeptorarm mit dem direkt an das Triamin gebundene Pyrrol sich günstig für die Bindung erweist und das β -Alanin, wenn es direkt neben dem Triamin sitzt keine zur Bindung beitragenden Wechselwirkungen ermöglicht. Diese Vermutung bestätigt auch die Tatsache, dass Rezeptor **72** mit 3 positiven Ladungen, also 0.5 Ladungen mehr als Rezeptor **100**, die DNA etwas schlechter bindet. (Nr. 13). Auch der Vergleich der Rezeptoren **101** und **102** deutet darauf hin, dass direkt am Triamin gebundene Gruppen nicht zu sterisch anspruchsvoll sein sollten (s. Cbz-Gruppe bei **101**) und Ammoniumgruppen bindungsfördernd auswirken. Diese Überlegungen stehen in Einklang mit den zuvor diskutierten Vermutungen, die beim Vergleich der Rezeptoren **75**, **87** und **89** gezogen wurden.

Beim Vergleich der Rezeptoren, die zusätzlich bei pH 5 vermessen wurden gilt ebenfalls die Tendenz: je höher die Ladungen desto größer ist die Stabilisierung (s. Abbildung 4-75).

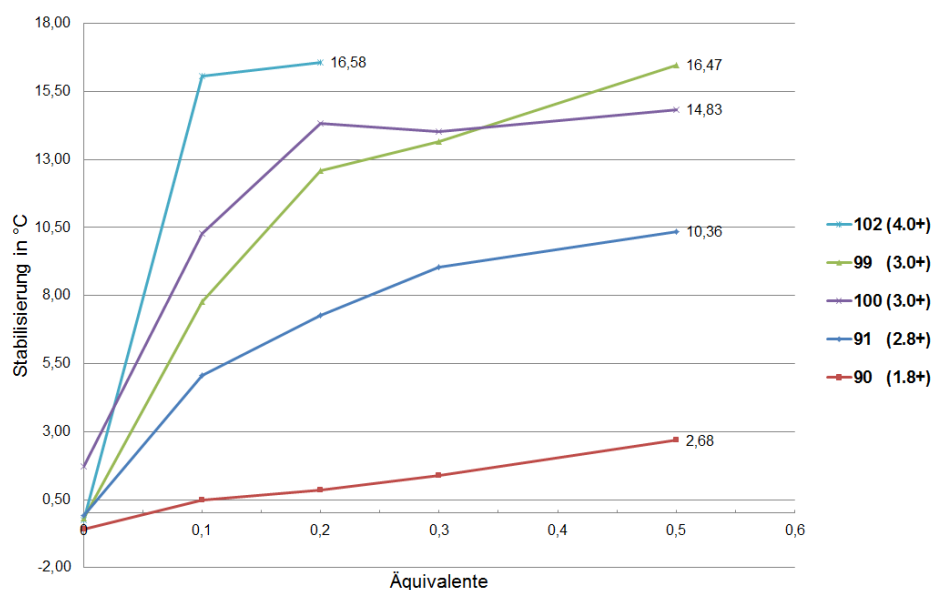


Abbildung 4-75: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der ctDNA in Abhängigkeit von der Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der Rezeptoren **90** (1.8 Ladungen), **91** (2.8 Ladungen), **99** (3 Ladungen), **100** (3 Ladungen), **102** (4 Ladungen) und **103** (Niederschlag ab 0.1 Äq., 5 Ladungen) bei pH 5.

Wie zu erwarten, ermöglichen alle Rezeptoren bei pH 5 eine größere Stabilisierung als bei pH 7 (z. B. von mehr als 2 °C bei Rezeptor **90** bis zu mehr als 10 °C bei Rezeptor **99**). Mit Ausnahme des Rezeptors **103** bleibt die Reihenfolge der Rezeptoren **90**, **91**, **100**, **99** und **102** in Bezug auf die Stärke der Stabilisierung bei beiden pH-Werten gleich.

Die Rezeptoren, die eine Stabilisierung von mehr als 5 °C erzielten und somit zu den besten Rezeptoren unter den vermessenen Verbindungen gehören, wurden in weiteren

Denaturierungsexperimenten mit künstlichen Polynukleotiden detaillierter untersucht. Neben **102**, **100** und **72** wurde auch Rezeptor **71** weiter untersucht, da er zwar nicht einen der höchsten Stabilisierungswerte besitzt aber trotz seiner geringen Ladung die DNA relativ gut bindet, sich somit deutlich von den restlichen Rezeptoren unterscheidet und die Untersuchung der nicht hauptsächlich auf ionischen Wechselwirkungen beruhenden Bindung ebenfalls von Interesse ist.

Thermische Denaturierungsexperimente der Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** mit weiteren künstlichen Polynukleotiden

Tabelle 4-7 zeigt die Ergebnisse der thermischen Denaturierungsexperimente der Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** mit den künstlichen Polynukleotiden $\text{pdA} \times \text{pdT}$, p(dAdT)_2 und RNA $\text{pA} \times \text{pU}$ im Vergleich mit ctDNA.

Rezeptor	Äquivalente	ΔT_m [°C]			ctDNA
		$\text{pdA} \times \text{pdT}$	p(dAdT)_2	$\text{pA} \times \text{pU}$	
102	0.1	7.70	7.47	7.63	3.09
	0.2	10.90	10.15	14.08	3.99
	0.3	10.82	11.27	15.74	5.70
	0.5	13.86	13.69	18.83	6.67
100	0.1	5.98	5.61	4.31	1.20
	0.2	10.09	9.36	7.59	3.50
	0.3	12.01	4.82*	7.71	2.71
	0.5	13.69	7.69*	12.32	6.44
72	0.1	3.12	5.32	1.93	1.46
	0.2	7.07	4.11	4.50	2.85
	0.3	8.20	5.36	4.14	2.70
	0.5	13.11	9.03	6.58	5.76
71	0.1	1.13	1.57	3.46	1.37
	0.2	2.66	2.50	5.34	1.41
	0.3	1.87	1.91	6.13	1.70
	0.5	3.99	3.87	7.08	4.83

Tabelle 4-7: Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der verschiedenen PN $\text{pdA} \times \text{pdT}$, p(dAdT)_2 und RNA $\text{pA} \times \text{pU}$ im Vergleich mit ctDNA bei Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten der Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71**. ($T_m(\text{pdA} \times \text{pdT}, \text{pH } 7) = 51.15$, $T_m(\text{p(dAdT)}_2, \text{pH } 7) = 43.45$, $T_m(\text{pA} \times \text{pU}, \text{pH } 7) = 42.06$, $T_m(\text{ctDNA}, \text{pH } 7) = 67.6$, * Niederschlag)

Die auf GC-basierenden künstlichen Polynukleotide weisen Schmelzpunkte auf, die zu hoch sind, um in Wasser gemessen zu werden und sind daher nicht für die Denaturierungsexperimente geeignet. Die zusätzlichen Messungen mit den künstlichen Polynukleotiden wurden unter denselben Bedingungen wie die zuvor durchgeführten Denaturierungen ausgeführt.

Bei der Bindung der Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** wird eine Präferenz für AT-reiche Sequenzen und für die RNA beobachtet. Dies deutet auf eine bevorzugte Bindung in sehr schmale Furchen hin.

Wie in Tabelle 4-7 zu sehen ist, stabilisiert Rezeptor **102** alle drei Polynukleotide und die ctDNA am stärksten. Einzige Ausnahme bildet Rezeptor **100** im Falle des Polynukleotids $\text{pdA} \times \text{pdT}$. Hier stabilisieren beide Rezeptoren das Polynukleotid in vergleichbaren Größen (**102**: 13.86 °C bei 0.5 Äq., **100**: 13.69 °C bei 0.5 Äq.).

Betrachtet man die in Abbildung 4-76 gezeigten Daten scheinen alle dargestellten Kurven, insbesondere im Falle der ctDNA, zwar noch keine endgültige Sättigung erreicht zu haben, aber sich kurz vor dem Bereich der Sättigung zu befinden. Rezeptor **102** bindet bevorzugt an RNA ($\text{pA} \times \text{pU}$). Die Stabilisierung liegt bei 18.83 °C (bei 0.5 Äq.). Wesentlich schwächer als die RNA aber dennoch mit relativ großen Stabilisierungswerten werden die beiden Polynukleotide $\text{pdA} \times \text{pdT}$ und p(dAdT)_2 gebunden ($\text{pdA} \times \text{pdT}$: 13.86 °C, p(dAdT)_2 : 13.69 °C). Am Kurvenverlauf in Abbildung 4-76 ist deutlich zu erkennen, dass **102** beide Polynukleotide in gleichem Maße bindet. Am geringsten wird ctDNA mit 6.67 °C (bei 0.5 Äq.) stabilisiert. Da die AT-Polynukleotide deutlich besser gebunden werden als ctDNA (ca. 42 % GC-Basenpaare) liegt die Vermutung nahe, dass bevorzugt AT-Basenpaare anstelle von GC-Basenpaaren gebunden werden.

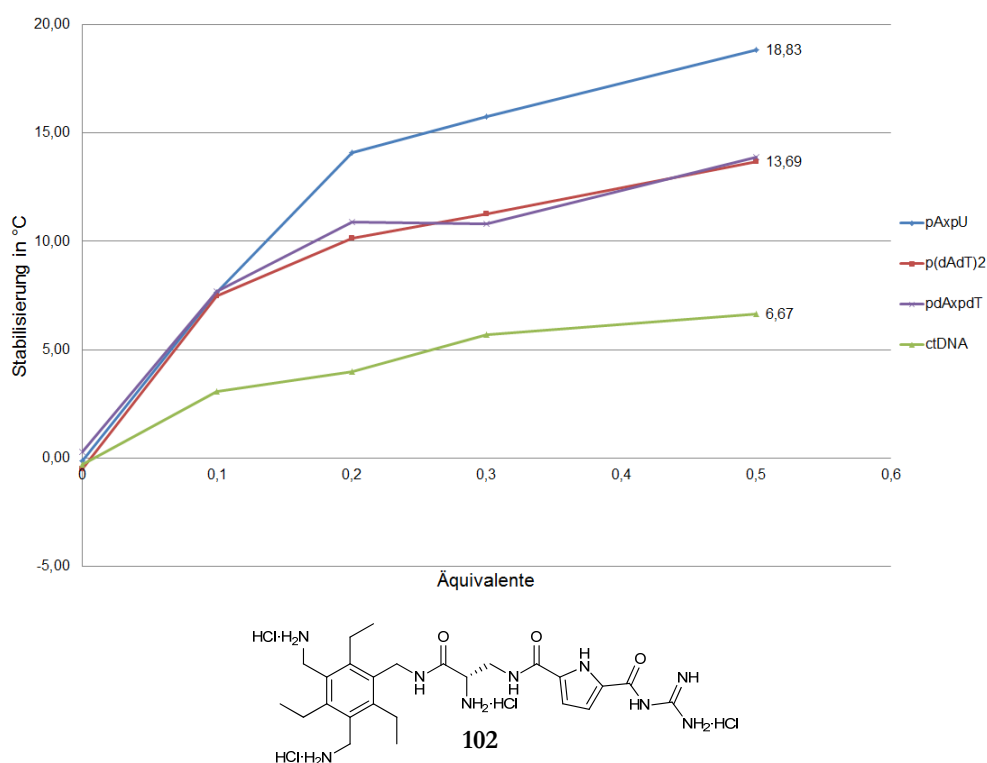


Abbildung 4-76: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der verschiedenen PN $\text{pdA} \times \text{pdT}$, p(dAdT)_2 und RNA $\text{pA} \times \text{pU}$ im Vergleich mit ctDNA bei Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten des Rezeptors **102** bei pH 7. Struktur des Rezeptors **102** (3.5 Ladungen).

Zusätzlich besitzen die Polynukleotide $\text{pdA} \times \text{pdT}$ (B^* -Form)¹⁶⁴ und p(dAdT)_2 (B-Form)¹⁶⁰ engere kleine Furchen (ca. 2.8 Å¹⁶⁰–3.2 Å²⁹) als ctDNA (ca. 6 Å), so dass Rezeptor **102** in den

schmalere kleinen Furchen eventuell durch bessere Wechselwirkung mit den Seitenwänden der Furche stärker binden kann. Das Polynukleotid $pA \times pU$ liegt in einer A-Form¹⁶⁵ vor und besitzt daher eine sehr enge große Furche (ca. 2.4 \AA)¹⁵, so dass **102** in diesem Fall in der großen Furche durch gute Passform und Wechselwirkung mit den Seitenwänden gut binden könnte (s. Abbildung 4-77).

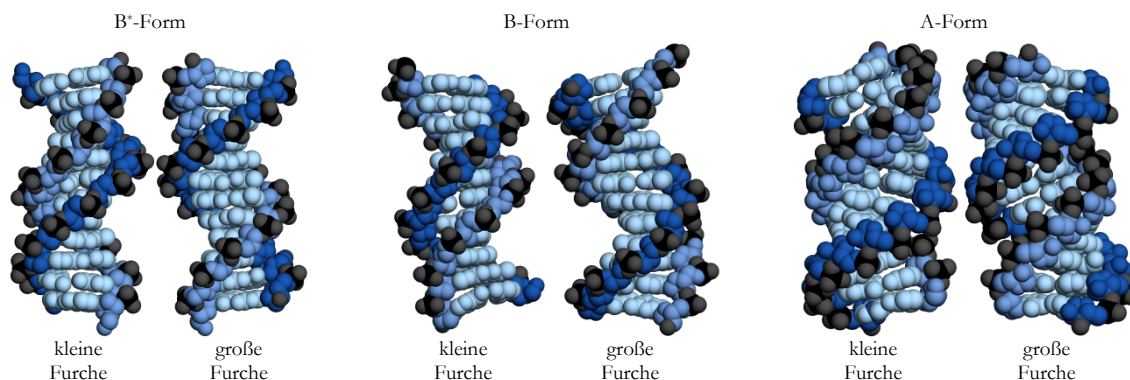


Abbildung 4-77: Von links nach rechts: Röntgenkristallstrukturen der kleinen und großen Furche der B*-DNA (PDB 1D98), B-DNA (PDB 1N4L) und A-DNA (PDB 1RNA).¹⁶⁰

Vergleicht man jedoch die beiden strukturell sehr ähnlichen Rezeptoren **102** und **100** fällt auf, dass die gute Stabilisierung der RNA im Falle von **102** nicht allein an der guten Passform liegen kann, sondern dass zusätzliche Wechselwirkungen eine Rolle spielen müssen. Der sehr ähnliche Rezeptor **100** bindet das Polynukleotid $pdA \times pdT$ ähnlich stark wie **102** (**100**: $13.69 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 \AA q. ; **102**: $13.86 \text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 \AA q.). Bei den thermischen Denaturierungsexperimenten von **100** und $p(dAdT)_2$ kam es bei den Messungen mit 0.3 und 0.5 Äquivalenten beim Erhitzen zu Niederschlägen, die die Messung störten. Daher können in diesem Fall keine weiteren Schlussfolgerungen gemacht werden, außer, dass die Kurven von $p(dAdT)_2$ und $pdA \times pdT$ bei 0.1 und 0.2 Äquivalenten nahezu gleich verlaufen (s. Abbildung 4-78).

Rezeptor **100** stabilisiert $p(dAdT)_2$, $pdA \times pdT$ und $pA \times pU$ deutlich stärker als ctDNA, $pdA \times pdT$ (und $p(dAdT)_2$) in gleichem Maße wie **102** und $pA \times pU$ etwas schlechter wie $pdA \times pdT$ aber wesentlich schlechter als **102**. Da auch Rezeptor **100**, ebenso wie Rezeptor **102**, die AT-Polynukleotide $p(dAdT)_2$ und $pdA \times pdT$ wesentlich besser bindet als ctDNA, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass Verbindung **100** bevorzugt AT-Basenpaare anstelle von GC-Basenpaaren bindet bzw. eine bessere Passform für die enge kleine Furche der AT-reichen Polynukleotide besitzt. Die Stabilisierung für $pA \times pU$ beträgt bei 0.5 Äquivalenten $18.83 \text{ }^\circ\text{C}$ für **102** und $12.32 \text{ }^\circ\text{C}$ für **100**.

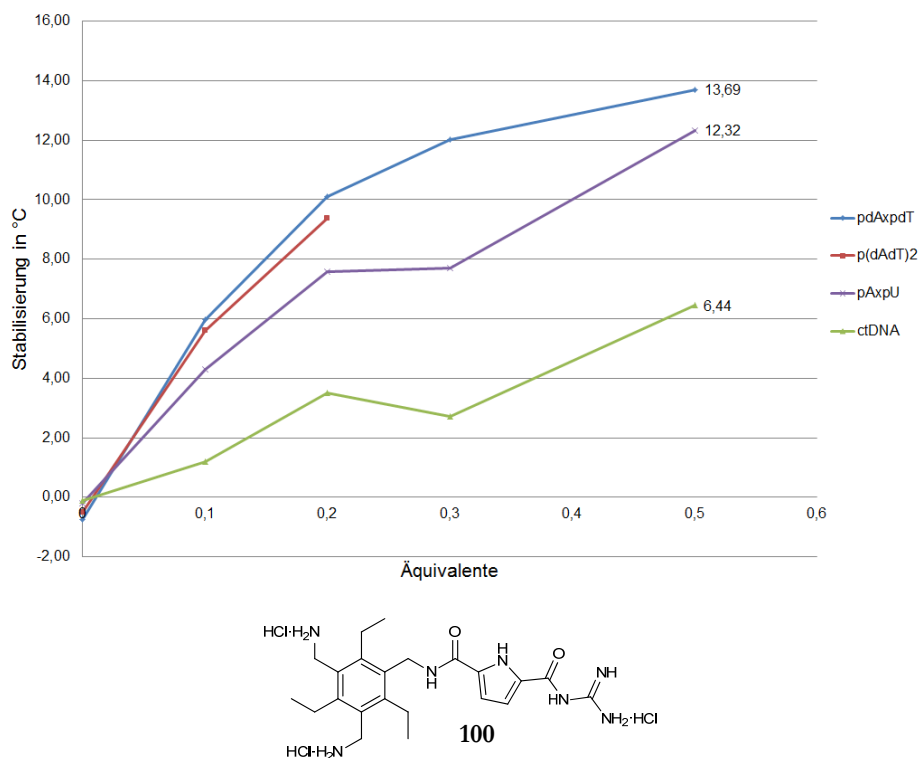


Abbildung 4-78: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der verschiedenen PN pdA \times pdT, p(dAdT)₂ und RNA pA \times pU im Vergleich mit ctDNA bei Zugabe von 0.1, 0.2, 0.3 und 0.5 Äquivalenten des Rezeptors **100** bei pH 7. Im Fall von p(dAdT)₂ bildet sich ab der Zugabe von 0.3 Äquivalenten des Rezeptors ein Niederschlag. Struktur des Rezeptors **100** (2.5 Ladungen).

Daraus lässt sich schließen, dass die starke Bindung von **102** an pA \times pU nicht hauptsächlich auf eine gute Passform zurückzuführen ist, da sonst **100** mit seiner sehr ähnlichen Struktur und Passform auch ähnlich gute Stabilisierungswerte erzielen müsste. Daher spielt vermutlich bei der Bindung von **102** an pA \times pU der zusätzliche Linker zwischen Triamin und Pyrrol mit seiner Ammoniumgruppe eine wichtige Rolle, die im Falle von pdA \times pdT nicht zum Tragen kommt.

Rezeptor **72** bindet ebenfalls pA \times pU (6.58 °C, bei 0.5 Äq.), p(dAdT)₂ (9.03 °C, bei 0.5 Äq.) und pdA \times pdT (13.11 °C, bei 0.5 Äq.) stärker als ctDNA (5.76 °C, bei 0.5 Äq.), allerdings in wesentlich geringerem Maße als **102** und **100** (s. Abbildung 4-79 links).

Rezeptor **71** ist unter den vier genauer untersuchten Rezeptoren derjenige, der die geringsten Stabilisierungswerte liefert. Eine Ursache ist vermutlich, wie schon zuvor diskutiert, die nur einfache positive Ladung. Trotz der geringeren Stabilisierung der Polynukleotide zeigt **71** eine eindeutige Präferenz gegenüber der RNA. Während p(dAdT)₂ (3.87 °C, bei 0.5 Äq.) und pdA \times pdT (3.99 °C, bei 0.5 Äq.) in ähnlichem Maße wie ctDNA gebunden werden, wird pA \times pU mit 7.03 °C (bei 0.5 Äq.) deutlich besser stabilisiert (s. Abbildung 4-79 rechts).

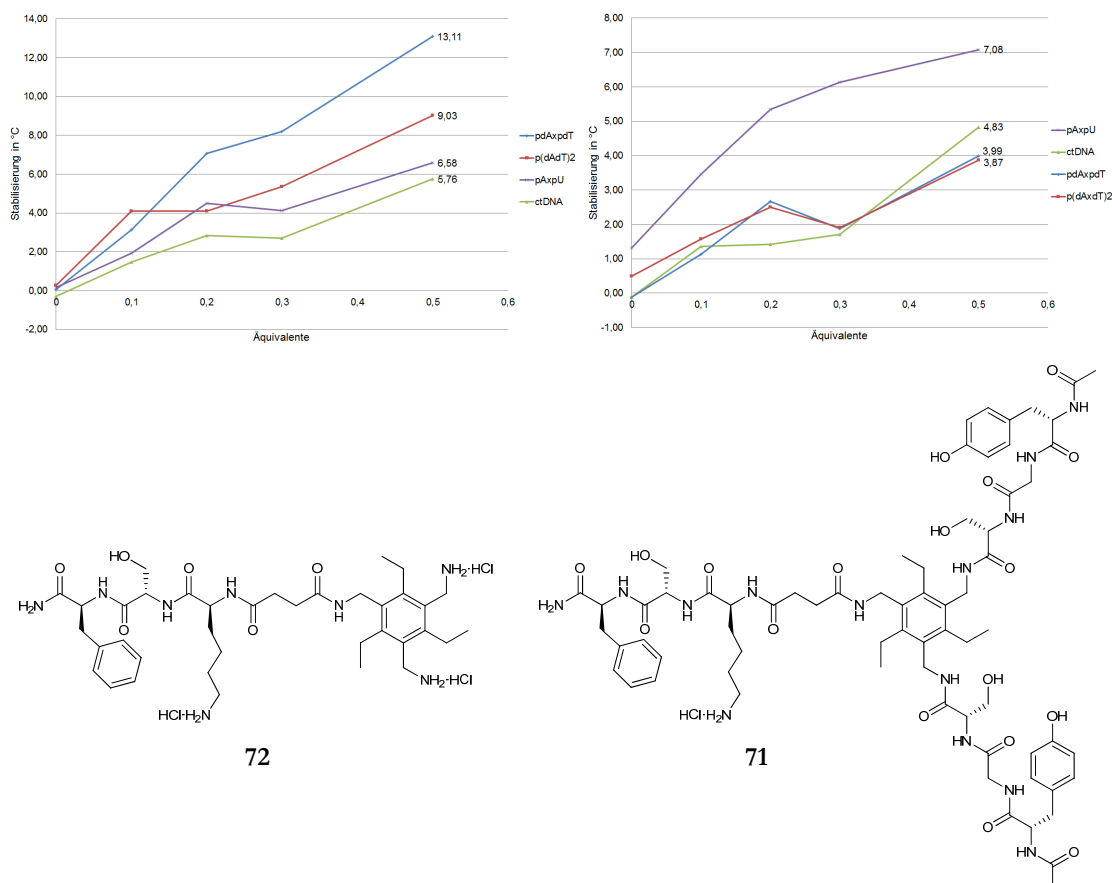


Abbildung 4-79: Graphische Darstellung der Stabilisierung (ΔT_m [°C]) der verschiedenen PN pdA \times pdT, p(dAdT)² und RNA pA \times pU im Vergleich mit ctDNA bei Zugabe von 0,1, 0,2, 0,3 und 0,5 Äquivalenten des Rezeptors **72** (links) und Rezeptor **71** (rechts) bei pH 7.

Die Ergebnisse der Denaturierungsexperimente zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl bei pH 7 als auch bei pH 5 im Großen und Ganzen die Regel gilt: je höher die Ladung des Rezeptors, desto größer ist die Stabilisierung der ctDNA. Bei Rezeptoren mit gleicher Ladung scheint sich die direkte Verknüpfung des Serins (mit und ohne Schutzgruppe der Seitenkette) mit dem Templat ungünstig auf die Stabilisierung auszuwirken, so dass diese Rezeptoren die ctDNA in geringerem Maße stabilisieren wie Rezeptoren gleicher Ladung und ohne Serin. Die auffälligste Ausnahme der obigen Regel bilden Rezeptor **86** mit sechs positiven Ladungen und **71** mit einer positiven Ladung. Rezeptor **86** besitzt unter den vermessenen Rezeptoren die höchste Ladung, stabilisiert aber trotz seiner sechs positiven Ladungen die ctDNA in ähnlichem Maße wie andere Rezeptoren mit drei positiven Ladungen. Ursache könnte die direkt mit dem Triamin verknüpfte Benzyl-geschützt Aminosäure Serin sein. Rezeptor **71** hingegen bindet mit einer positiven Ladung in der Größenordnung der Rezeptoren mit drei positiven Ladungen. Dies lässt vermuten, dass Rezeptor **71**, trotz des Serins, in der Lage ist neben ionischen Wechselwirkungen auch weitere entscheidende bindende Wechselwirkungen mit dem Boden und den Seitenwänden der DNA-Furche

auszubilden. Die besten Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** aus den thermischen Denaturierungsexperimenten mit ctDNA wurden mit weiteren künstlichen Polynukleotiden $\text{pdA} \times \text{pdT}$, p(dAdT)_2 und $\text{pA} \times \text{pU}$ vermessen. Allgemein wird eine Präferenz für AT-reiche Sequenzen und für die RNA beobachtet. Rezeptor **102** stabilisiert alle künstlichen Polynukleotide einschließlich ctDNA im Vergleich mit den anderen Rezeptoren am stärksten und erzielt mit der RNA die größten Stabilisierungswerte durch Bindung in die schmale große Furche der RNA. Rezeptor **100** und **72** binden bevorzugt an $\text{pdA} \times \text{pdT}$. Vermutlich ist die Passform der Rezeptoren besonders geeignet für die sehr schmale kleine Furche von $\text{pdA} \times \text{pdT}$. Rezeptor **71** ist unter den vier besten Rezeptoren, derjenige der die geringste Stabilisierung erzielt aber auch mit nur einer positiven Ladung die wenigsten ionischen Wechselwirkungen ausbilden kann. Die größte Stabilisierung erzielt Rezeptor **71** mit RNA.

Im folgenden Kapitel werden die qualitativen Bindungsstudien der Rezeptoren **71** und **86** mit Nukleotiden und Zuckern diskutiert.

4.3.2 Screening der Rezeptoren 71 und 86 mit biologisch relevanten Substraten

Um das generelle Potential des Rezeptordesigns gegenüber verschiedenen biologisch relevanten Substraten zu untersuchen, wurde ein einfaches quantitatives Selektionsverfahren benötigt. Im Anschluss an ein solches Selektionsverfahren kann die genaue Bindungsstärke der Substrate, die gebunden werden, in entsprechenden Bindungsstudien quantifiziert werden. Grundlage jeglicher Untersuchung – unabhängig ob quantitativer oder qualitativer Natur – der Rezeptor-Substrat-Komplexe ist, dass sich der gebildete Komplex in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften von den Eigenschaften der einzelnen, ungebundenen Rezeptor- und Substratmoleküle unterscheidet. Während der Komplexbildung kommt es durch die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat z. B. zu einer Verschiebung der Elektronendichte, was wiederum zu einer Veränderung der UV-Absorption, der chemischen Verschiebung von NMR-Signalen oder der Fluoreszenzintensität führen kann. Die Detektion und Auswertung der entsprechenden Observablen (z. B. der Fluoreszenzintensität) ermöglicht schließlich die Berechnung der Bindungsstärke. Entscheidend ist, dass die Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaft so groß ist, dass sie sowohl detektiert als auch mit den vorhandenen Methoden ausgewertet werden kann.

Für das geplante Selektionsverfahren wurden die Rezeptoren **71** und **86** ausgewählt (s. Abbildung 4-80).

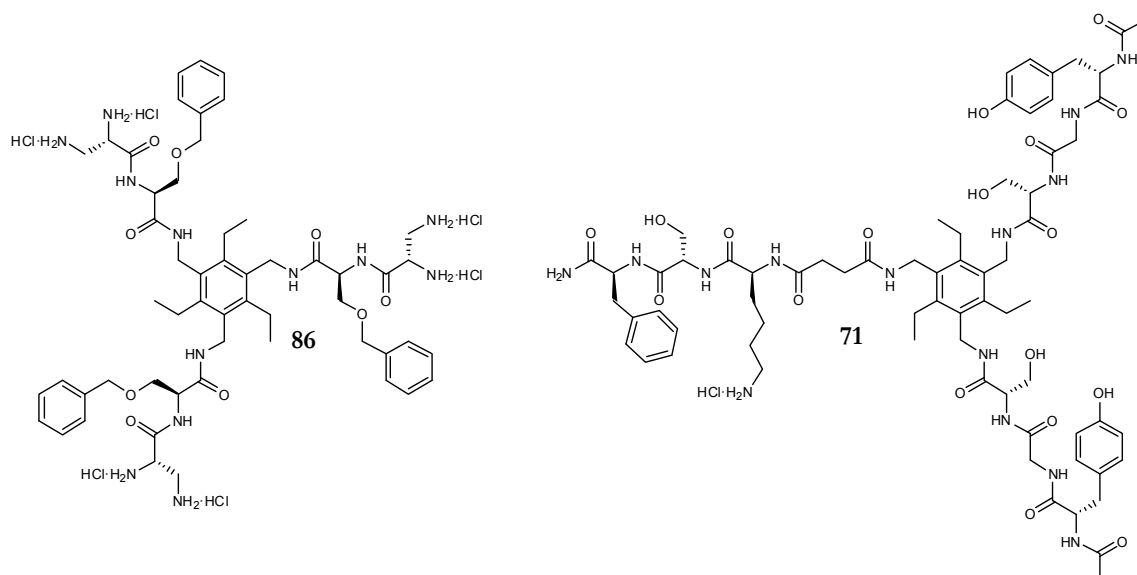


Abbildung 4-80: Strukturen der Rezeptoren **86** und **71**.

Beide Rezeptoren besitzen drei Arme, bestehend aus drei bzw. zwei Aminosäuren, verknüpft mit dem Triamin-Templat, so dass sie in der Lage sein sollten präorganisierte, das Substrat von allen Seiten umschließende Bindungsstellen zu bilden. Da die beiden Rezeptoren **86** und **71** ausschließlich funktionelle Gruppen besitzen, die das UV-Licht nur sehr schwach absorbieren, fiel die Wahl der Methode zur Beobachtung der Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften auf die Fluoreszenzspektroskopie. Zwar besitzen die ausgewählten Rezeptoren auch keine guten fluorophoren Gruppen, aber der Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie ist die um den Faktor 10^3 größere Empfindlichkeit gegenüber der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie. In der Fluoreszenzspektroskopie absorbiert das entsprechende Chromophor Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert längerwelliges Licht. Die Intensität dieser Lichtemission wird in der Regel in einem Winkel von 90° gemessen und dient zur Bestimmung der Bindungsstärke.

Als Substrate wurden die in Abbildung 4-81 gezeigten Verbindungen **108** - **150** ausgewählt. Die Auswahl der Substrate reicht unter anderem von verschiedenen Nukleotiden über DNA und Polynukleotide bis hin zu Mono-, Di- und Polysacchariden.

Substrat	Strukturformel	Substrat	Strukturformel
108 Adenosin A		130 D-(+)-Mannose	
109 Adenosine-5'-monophosphat, AMP		131 D-(+)-Maltose	
110 Adenosindiphosphat, ADP		132 D-(+)-Trehalose	

Substrat	Strukturformel	Substrat	Strukturformel
111 Adenosin-5'-triphosphat, ATP		133 Laktose	
112 Pyrophosphate	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	134 <i>D</i> -(+)-Cellobiose	
113 Phosphat	Na_3PO_4	135 Saccharose	
114 Cyclisches Adenosinmonophosphat, cAMP		136 <i>D</i> -Glucose-1-phosphat-	
115 Cytidinmonophosphat, CMP		137 <i>D</i> -(+)-Mannose-1-phosphat	
116 Uridin-5'-monophosphat, UMP		138 <i>D</i> -(+)-Galactose-1-phosphat	
117 Guanosin-5'-monophosphat, GMP		139 <i>D</i> -(+)-Glucopyranose-6-phosphate	
118 Uridin-5'-diphosphoglucose, UDPG		140 <i>D</i> -Fructose-1,6-diphosphat	
119 β -Nicotinamid-adenindinukleotid, NADH		141 <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -Glucosamin-1-phosphat	
120 ctDNA		142 <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -Glucosamin	
121 RNA		143 <i>D</i> -(+)-Glucosamin	
122 poly(dAdT) ₂		144 <i>D</i> -(+)-Glucuronsäure	
123 pdA × pdT		145 <i>N</i> -Acetylneuramin-säure	
124 poly(dGdC) ₂		146 Phytalsäure	
125 pdG × pdC		147 1,3,5-Cyclohexantri-carboxylsäure	

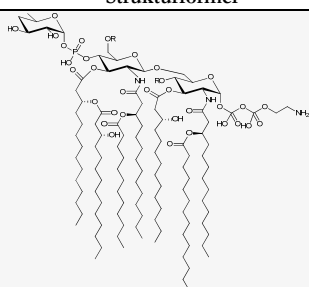
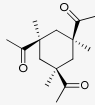
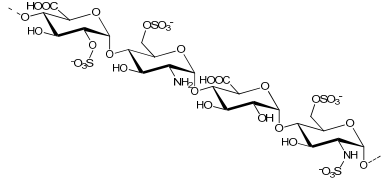
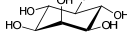
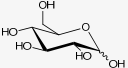
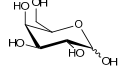
Substrat	Strukturformel	Substrat	Strukturformel
126 Lipopolysaccharid LPS		148 cis,cis-1,3,5- Trimethylcyclohexan- -1,3,5- tricarboxylsäure	
127 Heparin		149 myo-Inositol	
128 Glucose		150 Nitrat	NaNO ₃
129 D-(+)-Galactose			

Abbildung 4-81: Strukturen der vermessenen Substrate **108 - 150**.

Für das Screening der Substrate **108 - 150** wurden Lösungen der Rezeptoren mit jeweils 5, 10 und 20 Äquivalenten der Substrate versetzt und anhand der Änderung der relativen Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum Rückschlüsse auf eine mögliche Bildung entsprechender Rezeptor-Substrat-Komplexe gezogen. Mit Ausnahme der Polynukleotide **120 - 125** und des Substrats **126** wurden alle Substrate in Stammlösungen von $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in 0.01 M Cacodylat-Puffer bei pH 7 angesetzt. Die Stammlösung von Substrat **126** wurde aufgrund der geringen Löslichkeit in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (0.01 M Cacodylat-Puffer, pH 7) angesetzt. Die Stammlösungen der Polynukleotide und der ctDNA wurden wie in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben vorbereitet. Zur Durchführung des Screenings der Substrate mit Rezeptor **86** wurde bei 25 °C eine Lösung des Rezeptors ($4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 M Cacodylat-Puffer, pH 7) mit jeweils 5 und 10 Äquivalenten der entsprechenden Substrate versetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 min die Fluoreszenzemission im Bereich von 220-400 nm nach einer Anregung bei 220 nm gemessen. Aufgrund einer starken Änderung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe der Substrate **126** (LPS) und **146** (Phytinsäure) wurde die Konzentration des vorgelegten Rezeptors im Falle dieser beiden Substrate auf $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ halbiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte im Anschluss am Maximum von 302 nm. Das Screening der Substrate mit Rezeptor **71** ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 M Cacodylat-Puffer, pH 7) erfolgte durch Zugabe von je 5, 10 und 20 Äquivalenten und Messung der Fluoreszenz am Maximum von 305 nm nach 5 min Inkubationszeit bei einer Anregungswellenlänge von 220 nm. In jedem Screening wurde jede Messung zweimal durchgeführt. Zusätzlich wurden die Emissionsspektren der vermessenen Substrate bei der verwendeten Anregungswellenlängen von 220 nm überprüft. Keines der Substrate wies bei den entsprechenden Emissionsmaxima

der Rezeptoren eine nennenswerte Emission auf, so dass sie bei der Auswertung der Messdaten nicht berücksichtigt werden mussten. Zur Auswertung der Messdaten wurden die erhaltenen Intensitätswerte um den ebenfalls zuvor gemessenen Effekt der Verdünnung auf die Fluoreszenzintensität korrigiert. Die Änderung der relativen Fluoreszenzintensität wurde durch Berechnung der Differenz der Intensitätswerte, die durch Zugabe von 0, 5, 10 und 20 Äquivalenten Substrat gemessen wurden, erhalten. Abbildung 4-82 zeigt die Ergebnisse des quantitativen Fluoreszenzscreenings der Substrate **108 - 150** mit Rezeptor **86**.

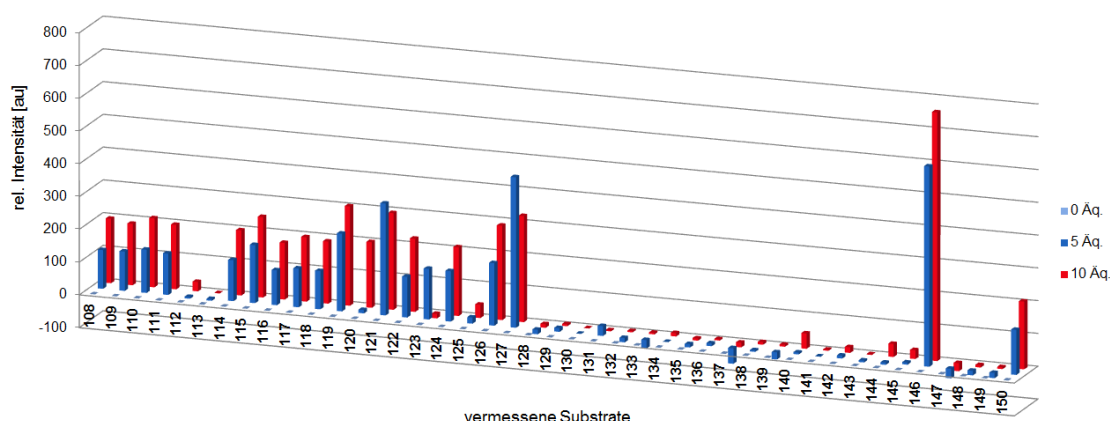


Abbildung 4-82: Ergebnisse des Fluoreszenzscreenings der Substrate **108 - 150** mit Rezeptor **86**. Die berechneten relativen Intensitätswerte wurden um den ebenfalls zuvor gemessenen Effekt der Verdünnung auf die Fluoreszenzintensität ($\Delta I = I_{\text{obs}} - I_R - I_S$) korrigiert und anschließend um den jeweiligen Wert der Intensität bei 0 Äquivalenten angepasst, so dass die Änderung der Intensität bei 0 Äquivalenten null betrug. Als genereller Fehler für die komplette Messreihe wurde der Mittelwert aller relativen Fluoreszenzintensität bei 0 Äquivalenten gewertet. Der generelle Fehler der Messungen liegt bei etwa ± 22 au.

In dem Fall, dass eine Änderung der relativen Fluoreszenzintensität gemessen wird, kann davon ausgegangen werden, dass eine Wechselwirkung zwischen Substrat und Rezeptor stattfindet bzw. dass das Substrat gebunden wird. Über die Bindungsstärke selber können nur sehr allgemeine Aussagen getroffen werden. So hat die Größe der Änderung nichts mit der Bindungsstärke zu tun, sondern der Unterschied zwischen den Fluoreszenzänderungen bei einer Erhöhung der Äquivalente (z.B. zwischen dem dunkelblauen und dem roten Balken) spiegelt die Bindungsstärke wieder. Sind die Balken im Diagramm z. B. nahezu gleich hoch wie im Fall von Substrat **121**, spricht dies für eine stärkere Bindung als für den Fall, dass der rote Balken höher ist als der dunkelblaue Balken wie im Fall von Substrat **122**. Sollte der rote Balken niedriger sein als der blaue Balken, wie z. B. bei Substrat **127** könnte dies z. B. für die Bildung eines zusätzlichen Komplexes mit anderen Eigenschaften sprechen.

Rezeptor **86** bindet alle Nukleotide **108 - 111** und **114 - 119**, alle Polynukleotide **121 - 125**, die Polysaccharide **126** und **127**, Phytinsäure **146** und Nitrat **150**. Die Mono- und Disaccharide **128 - 145** und die Phosphate **112** und **113** werden laut Schnelltest gar nicht gebunden. ctDNA **120** scheint nur sehr schwach gebunden zu werden, was in guter Übereinstimmung mit den

thermischen Denaturierungsexperimenten steht. RNA **121** hingegen scheint wesentlich besser als ctDNA gebunden zu werden.

Wie in Abbildung 4-82 zu sehen ist, sind bei vielen Substraten die Unterschiede zwischen den relativen Intensitäten recht ähnlich und es kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob sie gegen null laufen. Daher wurden im darauffolgenden Selektionsverfahren mit Rezeptor **71** die Messungen um eine zusätzliche Zugabe von 20 Äquivalenten Substrat erweitert. Abbildung 4-83 zeigt die Ergebnisse des Fluoreszenzscreenings der Substrate **108 - 150** mit Rezeptor **71**. Aus Abbildung 4-83 lässt sich ablesen, dass Rezeptor **71** alle Nukleotide **108 - 111** und **114 - 119** bindet während Phosphat **112** gar nicht und Phosphat **113** eventuell sehr schwach gebunden wird. Durch die zusätzliche Zugabe von 20 Äquivalenten der entsprechenden Substrate lässt sich wesentlich besser die Stärke der Bindung einschätzen. Dies ermöglicht einen besseren Vergleich der relativen Bindungsstärken der einzelnen Substrate. So ist deutlich zu erkennen dass die Nukleotide **109 - 111** (AMP, ADP, ATP) stärker gebunden werden als Substrat **108** (Adenin).

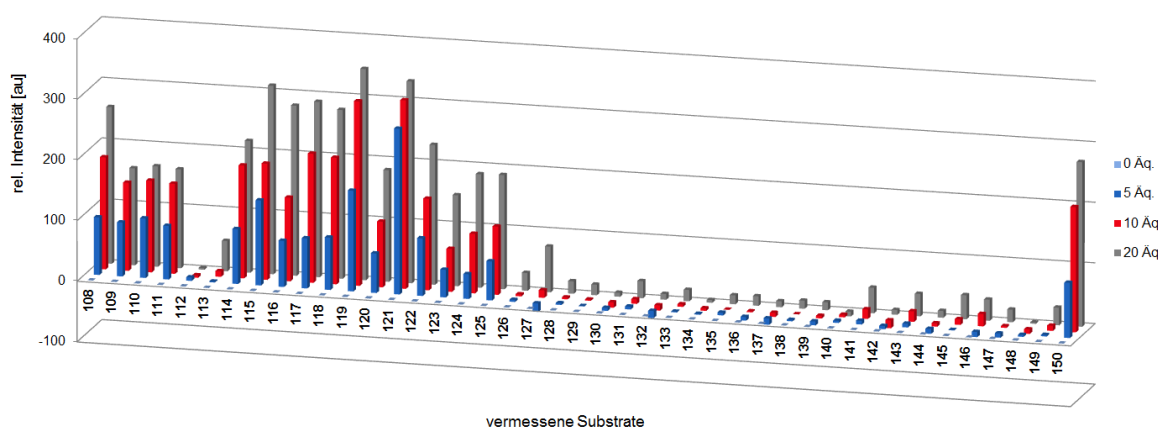


Abbildung 4-83: Ergebnisse des Fluoreszenzscreenings der Substrate **108 - 150** mit Rezeptor **71**. Die berechneten relativen Intensitätswerte wurden um den ebenfalls zuvor gemessenen Effekt der Verdünnung auf die Fluoreszenzintensität ($\Delta I = I_{\text{obs}} - I_R - I_S$) korrigiert und anschließend um den jeweiligen Wert der Intensität bei 0 Äquivalenten angepasst, so dass die Änderung der Intensität bei 0 Äquivalenten null betrug. Als genereller Fehler für die komplette Messreihe wurde der Mittelwert aller relativen Fluoreszenzintensität bei 0 Äquivalenten gewertet. Der generelle Fehler der Messungen liegt bei etwa ± 17 au.

Dies lässt vermuten, dass die Wechselwirkungen des Rezeptors nicht nur mit dem Purin-Baustein stattfinden, sondern dass zusätzliche Wechselwirkungen z. B. mit den Phosphat- oder Zuckerresten eine Rolle spielen. Allerdings scheinen die Wechselwirkungen mit alleinigem Phosphat **113** oder Zuckern **131**, **141**, **143**, **145** nur sehr schwach ausgeprägt zu sein. Dennoch tragen diese schwachen Wechselwirkungen messbar zur stärkeren Bindung des Purin-Bausteins bei. Die Polynukleotide **120 - 125** werden zwar gebunden, aber durch die verhältnismäßig große Änderung der relativen Intensität bei Zugabe von 20 Äquivalenten kann diese Bindung als generell mittelmäßig bis schwach eingeordnet werden. Allein die Bindung an die RNA (**121**)

scheint stärker als die Bindung an die anderen Polynukleotide zu sein. Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen der thermischen Denaturierungsexperimente des Rezeptors **71** (s. Kapitel 4.3.1.2). Auch Substrat **150** (Nitrat) wechselwirkt mit Rezeptor **71** ebenso wie Substrat **127** (Heparin), wenn auch vermutlich nur sehr schwach.

Bei den Ergebnissen aller Screenings muss jedoch auch bedacht werden, dass zwangsläufig durch die Wahl der Messmethode – in diesem Fall die Fluoreszenzspektroskopie – nur ein bestimmter Bereich des Rezeptors oder Komplexes bzw. eine bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaft beobachtet wird. Sollte also ein Substrat laut Screening nicht gebunden werden, besteht dennoch die Möglichkeit, dass Wechselwirkungen mit dem Rezeptor stattfinden, die nur nicht mit dieser Messmethode nachgewiesen werden. Auch kann die Wechselwirkung mit Gruppen stattfinden, die durch die gewählte Anregungswellenlänge nicht angeregt werden oder die Änderung der relativen Intensität so gering ist, dass sie im Fehlerbereich der Messung liegt. Tabelle 4-8 zeigt die im Screening ermittelten Rezeptor-Substrat-Komplexe, deren Bindungsstärken in den nun folgenden Fluoreszenz-Bindungsstudien quantifiziert werden.

Rezeptor	Substrate	Rezeptor	Substrate
86	109, 110, 111,	71	109, 110, 111,
	115, 119, 120,		114, 115, 119,
	121, 122, 123,		120, 121, 122,
	124, 127, 146,		123, 124, 143,
	150		150

Tabelle 4-8: Tabellarische Auflistung der Rezeptoren und Substrate, deren Bindungsstärken in Fluoreszenz-Bindungsstudien genauer quantifiziert werden.

4.3.3 Fluoreszenz-Bindungsstudien

4.3.3.1 Grundlagen zur Bestimmung der Bindungskonstante

Bei der Wahl der geeigneten Methode zur Bestimmung der Bindungsstärke sollte in der Regel beachtet werden, dass die unterschiedlichen Methoden für unterschiedlich große Bindungskonstanten geeignet sind (s. Tabelle 4-9).

Methode	Bindungskonstante [M ⁻¹]
¹³ C-NMR	< 10 ²
¹ H-NMR	< 10 ⁴
UV/Vis	< 10 ⁵
Fluoreszenz	10 ² - 10 ⁸
ITC	10 ² - 10 ⁸

Tabelle 4-9: Abhängigkeit der Methode zur Bestimmung der Bindungsstärke von der Größe der Bindungskonstante.

Da jedes der analytischen Verfahren einen optimalen Konzentrationsbereich besitzt, bedingt die Wahl der Methode auch die Größe der Startkonzentration des Rezeptors. Diese sollte reziprok der Bindungskonstante sein (+/- Faktor 10), um bei der mathematischen Auswertung gute Ergebnisse zu erhalten. Der Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie liegt darin, dass sie für einen großen Bereich von Bindungsstärken in der Größenordnung von 10^2 - 10^8 M⁻¹ geeignet ist. Einerseits ist sie sehr empfindlich, so dass sehr verdünnte Lösungen vermessen werden können. Andererseits kann für höher konzentrierte Lösungen die Spaltbreite des Photometers angepasst werden, um auch kleine Bindungsstärken zu messen. Zur Quantifizierung der Bindungsstärke der durch das Screening ausgewählten Rezeptor-Substrat-Komplexe wurde daher –wie für das Screening – die Fluoreszenzspektroskopie herangezogen.

Gleichung 4-1 und 4-2* beschreiben auf Grundlage des Massenwirkungsgesetzts und unter Annahme eines 1:1-Komplexes die proportionale Abhängigkeit der Konzentration des Komplexes [RS] von der Assoziations- K_{Ass} bzw. Dissoziationskonstante K_{Diss} und der Startkonzentrationen des Rezeptors $[R]_0$ und des Substrats $[S]_0$ einer sich im Gleichgewicht befindlichen Lösung von Rezeptor und Substrat.

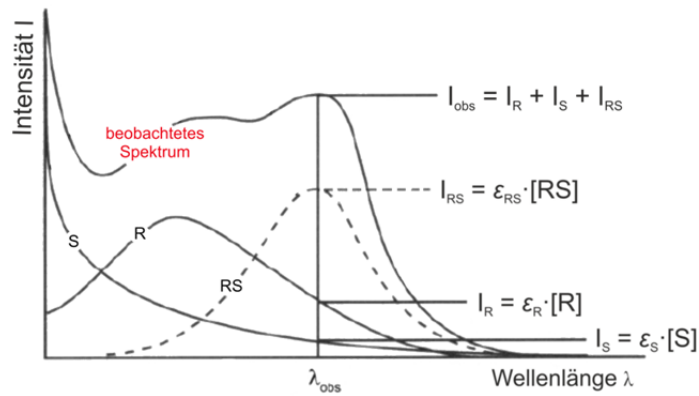
$$[RS] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_0 + [S]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_0 + [S]_0 \right)^2 - 4 \cdot [R]_0 \cdot [S]_0} \right\} \quad 4-1$$

$$[RS] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ K_{\text{Diss}} + [R]_0 + [S]_0 - \sqrt{(K_{\text{Diss}} + [R]_0 + [S]_0)^2 - 4 \cdot [R]_0 \cdot [S]_0} \right\} \quad 4-2$$

Mit [RS] = Komplexkonzentration im Gleichgewicht, K_{Ass} = Assoziationskonstante, K_{Diss} = Dissoziationskonstante, $[R]_0$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S]_0$ = Startkonzentration des Substrats.

Anhand der Gleichungen ist zu erkennen, dass sich theoretisch die Bindungskonstante durch Bestimmung der Komplexkonzentration im Gleichgewicht berechnen lässt ($[R]_0$ und $[S]_0$ sind bekannt). Im Fall der Fluoreszenzspektroskopie setzt sich die gemessene Intensität einer sich im Gleichgewicht befindlichen Lösung des Rezeptors und des Substrats jeweils aus den drei einzelnen Fluoreszenzspektren des Rezeptors, des Substrats und des Komplexes zusammen und ist direkt proportional zu deren Konzentration (s. Abbildung 4-84). Durch Subtraktion der Spektren des Rezeptors und Substrats vom beobachteten Gesamtspektrum kann das Spektrum des Komplexes und damit theoretisch dessen Konzentration erhalten werden.

* Zur detaillierten Herleitung der Gleichungen 4-1 und 4-2 siehe Literaturstellen 167 und 168.



$$I = \varepsilon \cdot d \cdot c \quad 4-3$$

$$I = \varepsilon_R \cdot [R] + \varepsilon_S \cdot [S] + \varepsilon_{RS} \cdot [RS] \quad 4-4$$

Abbildung 4-84: Schematische Darstellung des beobachteten Fluoreszenz-Spektrums. Das während der Titration aufgenommene Spektrum setzt sich aus den überlagerten Spektren des Rezeptors R, des Substrats S und des Komplexes RS zusammen.¹⁶⁶ Mit I = experimentell gemessene Intensität, ε = molarer Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Messküvette (d = 1 cm), c = Konzentration der absorbierenden Spezies, ε_R = molarer Extinktionskoeffizient des Rezeptors, ε_S = molarer Extinktionskoeffizient des Substrates, ε_{RS} = molarer Extinktionskoeffizient des Komplexes, [R] = Konzentration des Rezeptors im Gleichgewicht, [S] = Konzentration des Substrats im Gleichgewicht, [RS] = Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht.

Wird die Intensität, die proportional zur Komplexkonzentration [RS] ist (s. Gleichung 4-4), bei einer bestimmten Wellenlänge (λ_{obs}) – vorzugsweise am lokalen Maximum – unter Annahme des *Lambert-Beer'schen*-Gesetzes (4-3) mit Gleichung 4-1 verknüpft erhält man Gleichung 4-5.^{*167,168}

$$I = \varepsilon_R \cdot [R]_0 + \varepsilon_S \cdot [S]_0 + \frac{\Delta \varepsilon}{2} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_0 + [S]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R]_0 + [S]_0 \right)^2 - 4 \cdot [R]_0 \cdot [S]_0} \right\} \quad 4-5$$

Die einzig verbleibende unbekannte Konstante ist der molare Extinktionskoeffizient des Komplexes ε_{RS} . Somit ist zur Bestimmung der Bindungskonstante ein Titrationsexperiment notwendig, bei dem die Änderung der Fluoreszenzintensität der Emission bei sukzessiver Veränderung der Startkonzentrationen des Rezeptors [R₀] und Substrat [S₀] verfolgt wird. Abbildung 4-85 zeigt beispielhaft ein solches Fluoreszenz-Titrationsexperiment (links) und die Auftragung der Intensitäten am Maximum von 302 nm über den entsprechenden Äquivalenten (rechts, schwarze Punkte). Während der Titration verursacht die Verdünnung der Probe eine Abnahme der Intensität, die jedoch mit Hilfe des *Lambert-Beer'schen*-Gesetzes berechnet werden kann (rote Kurve). Der Unterschied zwischen der berechneten Verdünnung und der gemessenen Intensität wird durch die Komplexbildung hervorgerufen.

* Zur detaillierten Herleitung der Gleichung 4-5 siehe Literaturstellen 167 und 168.

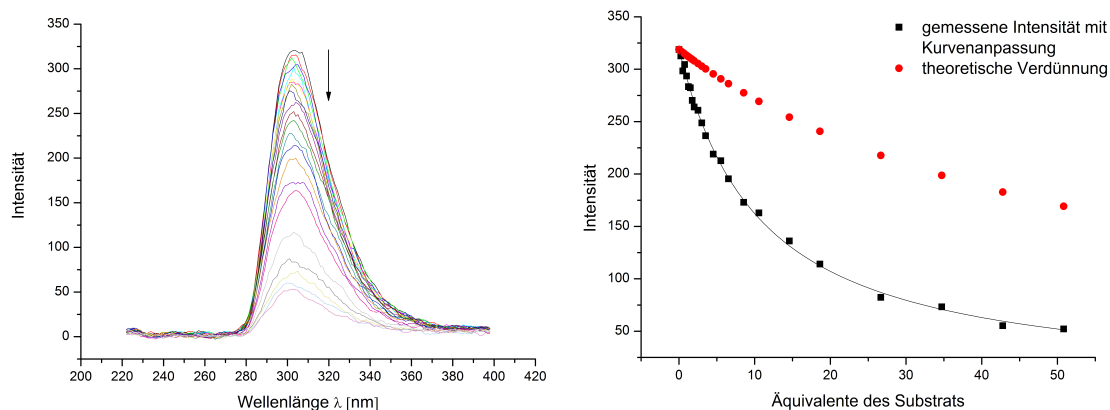


Abbildung 4-85: Fluoreszenz-Titrationsexperiment zur Bestimmung der Bindungskonstante. **Links:** Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei 302 nm während der Titration aufgrund der Komplexbildung. **Rechts:** Zugehörige Bindungsisotherme mit Kurvenanpassung (schwarz) und theoretischer Verdünnung (rot).

Aus Gleichung 4-5 leitet sich auch Gleichung 4-6 ab und berücksichtigt zusätzlich den Effekt der Verdünnung auf die gemessenen Intensitäten.

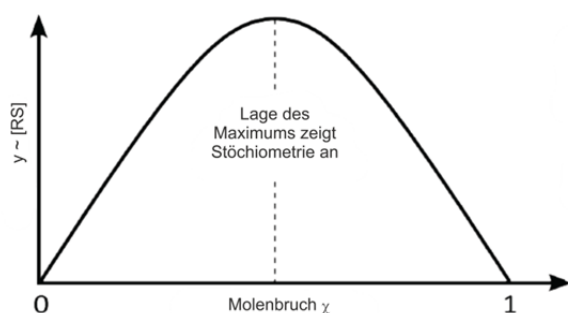
$$I = \frac{I_0}{1+x} + \frac{\varepsilon_S \cdot [S]_0 \cdot x}{1+x} + \frac{\frac{[R]_0}{1+x} \cdot \Delta\varepsilon \cdot K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0 \cdot [S]_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]}{1 + K_{Ass} \cdot \left[\frac{[S]_0 \cdot x}{1+x} - \frac{K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0 \cdot [S]_0 \cdot x}{(1+x)^2}}{\left(1 + K_{Ass} \cdot \frac{[S]_0 \cdot x}{1+x}\right)^2 + K_{Ass} \cdot \frac{[R]_0}{1+x}} \right]} \quad 4-6$$

mit I = experimentell gemessene Intensität, I_0 = experimentell gemessene Intensität des Rezeptors bei der Startkonzentration $[R]_0$, ε_S = molarer Extinktionskoeffizient des Substrates, $\Delta\varepsilon$ = Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen Komplex und freiem Rezeptor und freiem Substrat, $[R]_0$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S]_0$ = Startkonzentration des Substrates, K_{Ass} = Assoziationskonstante, x = Verdünnungsfaktor.

Mit Hilfe computergestützter Analysenprogramme wie *Origin* kann mittels nicht-linearer Regressionsanalyse die durch Gleichung 4-6 beschriebene Funktion an die gemessenen Datenpunkte angeglichen (schwarze Kurve) und die Bindungskonstante K_{Ass} bestimmt werden. Voraussetzung zur Verwendung der Gleichung ist die Bildung eines 1:1-Komplexes und die Gültigkeit des *Lambert-Beer'schen*-Gesetzes im Konzentrationsbereich der Titration. Die Herleitung der Gleichung beruht unter anderem auf der Annahme, dass die Komplexbildung sich durch die Beobachtung einer Wellenlänge verfolgen lässt. Für den Fall, dass während der Titration neben der Zu- oder Abnahme der beobachteten Bande auch eine Wanderung der Bande zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen stattfindet – das *Lambert-Beer'sche*-Gesetz somit seine Gültigkeit verliert – ist keine einfache nicht-lineare Regressionsanalyse einer einzelnen Wellenlänge mehr möglich. In diesem Fall oder auch wenn kein 1:1-Komplex

vorliegen sollte, müssen extra für die Spektroskopie entwickelte Programme wie *SpecFit*¹⁶⁹ verwendet werden.

Die mathematische Berechnung und die Wahl des geeigneten Computerprogramms sind abhängig von der Bindungsstöchiometrie. Ein Verfahren zur Bestimmung der Bindungsstöchiometrie ist die „Methode der kontinuierlichen Veränderung“, auch *Job-Plot* genannt.¹⁷⁰ Hierbei wird eine der Komplexkonzentration proportionale Observable z. B. die Fluoreszenzintensität, über dem Molenbruch χ aufgetragen (s. Abbildung 4-86).*



für Fluoreszenz-Spektroskopie:

$$y = I_{\text{obs}} - \varepsilon_R \cdot [R]_t - \varepsilon_S \cdot [S]_t$$

$$\chi = \frac{[R]_t}{[R]_t + [S]_t}$$

Abbildung 4-86: *Job-Plot* zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie.†

Am Maximum (oder Minimum) der resultierenden Kurven kann die Stöchiometrie des untersuchten Komplexes direkt abgelesen werden. Bei einem Molenbruch von z. B. 0.5 handelt es sich um einen 1:1-Komplex, bei einem Molenbruch von 0.33 um eine 1:2-Komplex und bei 0.67 um einen 2:1-Komplex. Voraussetzungen für die Durchführung eines *Job-Plots* sind, dass die Gesamtkonzentration des Rezeptors und Substrat, pH und Ionenstärke konstant bleiben, dass das *Lambert-Beer'sche-Gesetz* gültig ist und ein Komplex unter den Bedingungen des Experiments dominiert.¹⁷¹

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Wechselwirkung mit großen Biomolekülen wie Proteinen und Polynukleotiden sind die zuvor hergeleitete Gleichung 4-6 und auch das Programm *SpecFit* gar nicht oder nur bedingt geeignet. Gleichung 4-6 ist nur für Systeme, die 1:1-Komplexe bilden, anwendbar. Bei großen Biomolekülen wie der DNA oder Polynukleotiden existiert eine Vielzahl von möglichen Bindungsstellen, die zusätzlich auch unterschiedliche Affinitäten gegenüber dem bindenden Molekül besitzen können. Hinzu kommt, dass die Bindung spezifisch oder nicht-spezifisch als auch kooperativ oder nicht-kooperativ verlaufen kann. Die Vielzahl dieser möglichen Arten der Wechselwirkung erschwert die Auswertung der Messdaten und die Größe der Wechselwirkungen zwischen Biomolekül

* Zur detaillierten Durchführung des *Job-Plots* siehe Literaturstelle 168.

† Zur detaillierten Herleitung der Formeln siehe Literaturstellen 167 und 168.

und dem zu untersuchenden Molekül können nur näherungsweise verfolgt werden. Eine Voraussetzung, um *SpecFit* zur Auswertung der Messdaten nutzen zu können, ist das Wissen über die Komplekstöchiometrie. Allerdings ist der *Job*-Plot nicht in der Lage die Bestimmung der Komplekstöchiometrie bei komplexeren Systemen wie großen Biomolekülen zu leisten. Daher können die Messdaten eines Titrationsexperiments mit z. B. DNA nicht ohne weiteres mit *SpecFit* ausgewertet werden. G. *Scatchard* entwickelte ausgehend vom Massenwirkungsgesetz die sogenannte *Scatchard*-Gleichung (s. Gleichung 4-7) für Makromoleküle mit Bindungsstellen, die durch eine identische intrinsische Bindungskonstante charakterisiert sind.^{172,173} Gleichung 4-8 entspricht der *Scatchard*-Gleichung und wurde zur Auswertung von Fluoreszenz bzw. UV-Messdaten angepasst.*

$$\frac{\nu}{[S]} = K_{Ass} \cdot n - K_{Ass} \cdot \nu \quad 4-7$$

$$\text{mit: } \nu = \frac{[\text{gebundener Rezeptor}]}{[\text{Polynukleotid}]} = \frac{[RS]}{[S] + [RS]}$$

$$\frac{\Delta I}{[S]_0} = K_{Ass} \cdot \Delta \varepsilon \cdot [R]_0 - K_{Ass} \cdot \Delta I \quad 4-8$$

mit $\Delta I = [RS] \cdot \Delta \varepsilon = I - \varepsilon_R \cdot [R]_0 - \varepsilon_S \cdot [S]_0$, $\Delta \varepsilon$ = Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen Komplex und freiem Rezeptor und freiem Substrat, $[R]_0$ = Startkonzentration des Rezeptors, $[S]_0$ = Startkonzentration des Substrats, $[S]$ = Konzentration des Substrats, K_{Ass} = Assoziationskonstante, n = Anzahl der Bindungsstellen.

Abbildung 4-87 zeigt den Vergleich der Bindungsisotherme und ihrer linearisierten Form, dem sogenannten *Scatchard*-Plot. Die Bindungskonstante lässt sich beim *Scatchard*-Plot direkt aus der Steigung ablesen.

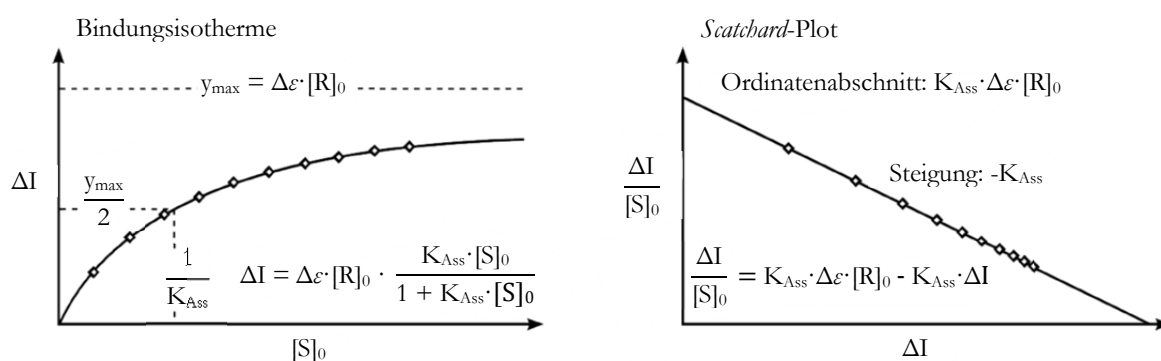


Abbildung 4-87: Vergleich der Bindungsisotherme (links) und der linearisierten Form, dem sog. *Scatchard*-Plot (rechts). Durch die Linearisierung verändert sich sowohl die Gewichtung der Datenpunkte als auch deren Fehler. Dies kann zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Bindungskonstante führen.

* Zur Herleitung der Gleichung siehe Literaturstelle 168.

Die Linearisierung der Bindungsisothermen hat allerdings zur Folge, dass sich die Gewichtung der Datenpunkte und damit die Auswirkung der Fehler verändert. Während bei der Auftragung der Messpunkte in Form der Bindungsisothermen der Abstand zwischen den einzelnen Punkten gleich ist, rücken die Datenpunkte durch die Linearisierung zum Ende des Experiments zusammen. Fehler am Anfang der Messung wirken sich dadurch stärker auf die Steigung und damit die Bindungskonstante aus als Fehler am Ende des Experiments. Aus diesem Grund wird heutzutage in der Regel die nicht-lineare Regressionsanalyse der linearen vorgezogen um die Bindungskonstante direkt aus der Bindungsisothermen bestimmen zu können. Aus diesem Grund wurde zur Auswertung der Messdaten der Titrationsexperimente mit DNA oder Polynukleotiden Gleichung 4-9, die sich aus der *Scatchard*-Gleichung^{172,173} ableitet, verwendet.^{174,175,176}

$$I = I_0 + \frac{I_{\text{lim}} - I_0}{2 \cdot [R]} \cdot \left\{ \frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R] + n \cdot [S] - \sqrt{\left(\frac{1}{K_{\text{Ass}}} + [R] + n \cdot [S] \right)^2 - 4 \cdot [R] \cdot n \cdot [S]} \right\} \quad 4-9$$

mit I = Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Polynukleotid, I_0 = Fluoreszenzintensität des vorgelegten Rezeptors, I_{lim} = Fluoreszenzintensität des gebildeten Komplexes wenn in Lösung kein freier Rezeptor mehr vorhanden ist, $[R]$ = Konzentration des zu untersuchenden Rezeptors in Lösung, $[S]$ = Konzentration des Polynukleotides, K_{Ass} = zu bestimmende Bindungskonstante, n = Verhältnis der Konzentration gebundenen Rezeptors zur Konzentration des Polynukleotides.

Mit Hilfe des Programms Statistica kann analog zu Gleichung 4-6 mit den bekannten Werten für I_0 , $[R]$ und $[S]$ über nicht-lineare Regressionsanalyse die Bindungskonstante und das Bindungsverhältnis n bestimmt werden.¹⁷²

4.3.3.2 Durchführung der Fluoreszenz-Bindungsstudien

Bindungsstudien zu Rezeptor 71

Die Bindungsstudien mit Rezeptor **71** wurden in Cacodylat-Puffer (0.01 M) bei 25 °C und pH 7 mit den Nukleotiden Adenosinmonophosphat (AMP, **109**), Adenosindiphosphat (ADP, **110**), Adenosintriphosphat (ATP, **111**), cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP, **114**), Cytidinmonophosphat (CMP, **115**), NADH (**119**), dem Zucker *D*-Glucosamin (**143**), Nitrat (**150**), ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) durchgeführt (s. Abbildung 4-88).

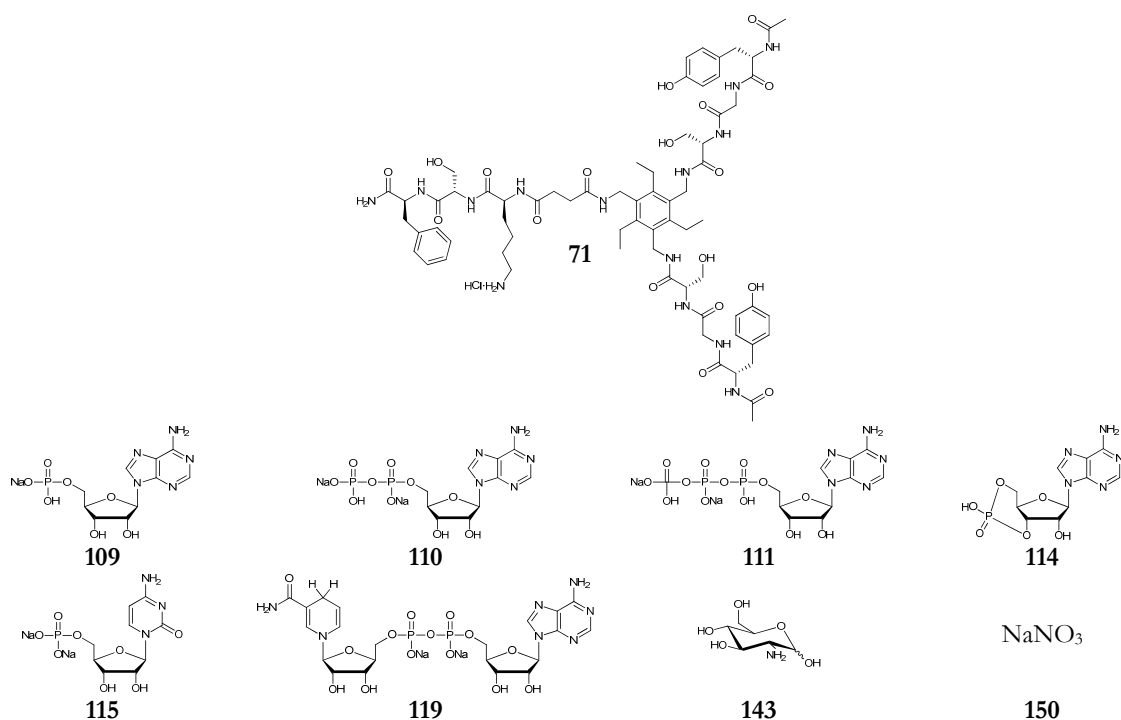


Abbildung 4-88: Substrate der Bindungsstudien mit Rezeptor **71** Adenosinmonophosphat (AMP, **109**), Adenosindiphosphat (ADP, **110**), Adenosintriphosphat (ATP, **111**), cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP, **114**), Cytidinmonophosphat (CMP, **115**), NADH (**119**), dem Zucker *D*-Glucosamin (**143**) und Nitrat (**150**).

Die Bestimmung der Komplexstöchiometrie des Rezeptors **71** mit den ausgewählten Substraten **109-111**, **114**, **115**, **119**, **143** und **150** mit Hilfe des *Job*-Plots ergab für alle Komplexe ein 1:1-Verhältnis (s. Abbildung 4-89). Jedes Experiment wurde mindestens zweimal durchgeführt.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden Fluoreszenz-Titrationsexperimente für alle Substrate in Cacodylat-Puffer, bei pH 7 und 25 °C durchgeführt. Die Titration erfolgte durch Zugabe von Aliquoten zunehmenden Volumens einer Stammlösung des jeweiligen Substrats ($[\text{S}] = 1.15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) zu einer Lösung des Rezeptors (Mikroküvette, 800 μl , $[\text{R}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Nach jeder Substratzugabe wurde nach einer Inkubationszeit von 3 min das Emissionsspektrum von 220 - 400 nm nach Einstrahlung einer Anregungswellenlänge von 220 nm aufgenommen. Zur detaillierten Durchführung der Titration siehe Kapitel 6.5.3. In allen Titrationsexperimenten, mit Ausnahme von Substrat **143** (*D*-Glucosamin), resultiert die Zugabe von Substrat in einer starken Abnahme der Emission. Im Fall von Substrat **143** führt die Zugabe von Substrat zu einer leichten Emissionszunahme. Eine signifikante Verschiebung der Emissionsmaxima während der Titration wurde in keinem Fall beobachtet. Die einzelnen Abbildungen der Titrationsexperimente und ihrer Auswertung befinden sich im Anhang (s. Kapitel 7.1.2).

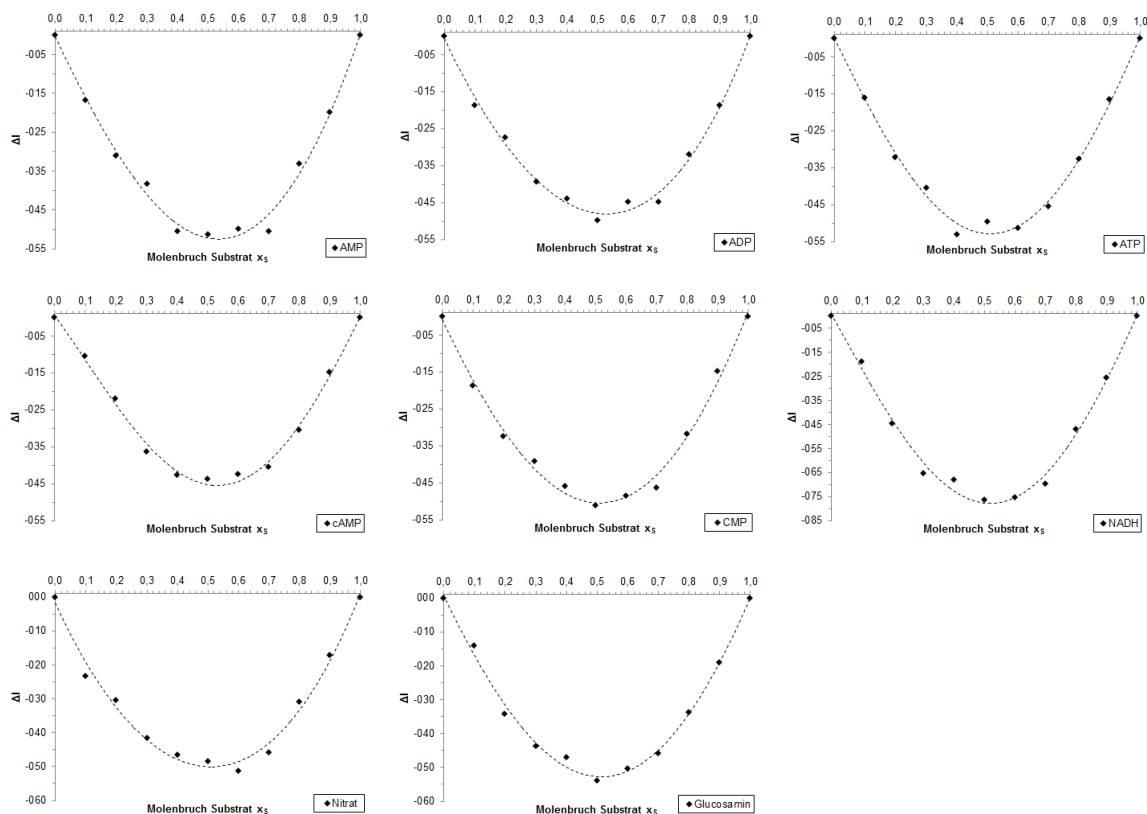


Abbildung 4-89: Die *Job*-Plots der Substrate AMP (**109**), ADP (**110**), ATP (**111**), cAMP (**114**), CMP (**115**), NADH (**119**), *D*-Glucosamin (**143**) und Nitrat (**150**) zeigen eine 1:1 Komplexstöchiometrie. Die Spektren wurden in Cacodylat-Puffer (0.01 M) bei 25 °C, pH 7 und einer Gesamtkonzentration von $[R] + [S] = 20 \mu\text{M}$ aufgenommen. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mit den Intensitätswerten am Emissionsmaximum von 303 nm. Über dem Molenbruch des jeweiligen Substrats wurde $\Delta I = I_{\text{obs}} - I_{\text{R}} - I_{\text{S}}$ aufgetragen.

Die Auswertung der Titrationsdaten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit den Programmen *Origin* und *SpecFit* ergab die in Tabelle 4-10 aufgelisteten und in Abbildung 4-90 graphisch dargestellten Bindungskonstanten der gebildeten Komplexe des Rezeptors **71** mit dem jeweiligen Substrat.

Substrat	K [M ⁻¹]	<i>Origin</i> log K	σ [M ⁻¹]	K [M ⁻¹]	<i>SpecFit</i> log K	σ [M ⁻¹]
AMP 109	3800	3.58	230	3800	3.59	24
ADP 110	4300	3.63	200	4200	3.62	43
ATP 111	4800	3.69	310	4900	3.69	40
cAMP 114	3000	3.47	180	3000	3.47	25
CMP 115	5100	3.71	190	5200	3.71	25
NADH 119	9300	3.97	290	11600	4.07	100
<i>D</i> -Glucosamin 143	2400	3.38	630	2000*	3.31*	80
Nitrat 150	3700	3.57	290	3700	3.57	27

Tabelle 4-10: Bindungskonstanten (K und log K, gerundete Werte) und die entsprechende Standardabweichung σ berechnet mit den Programmen *Origin* und *SpecFit* für die Bildung der jeweiligen 1:1-Komplexe mit Rezeptor **71**. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten mit *Origin* erfolgte am Maximum von 303 nm. *) zu wenig Zugaben für eine optimale Berechnung der Bindungskonstante mit *SpecFit*.

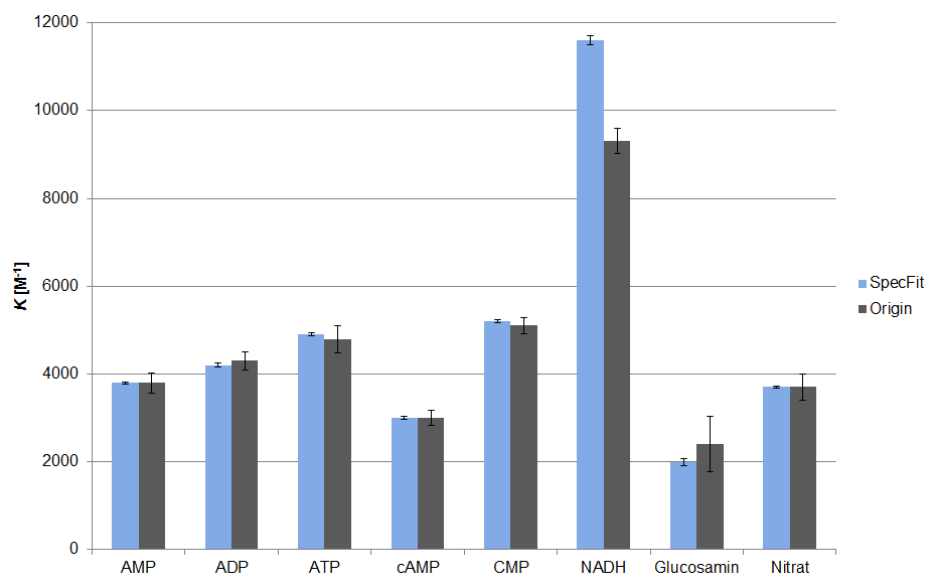


Abbildung 4-90: Graphische Präsentation der mit *Origin* und *SpecFit* ermittelten Bindungskonstanten der Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit den Substraten AMP (**109**), ADP (**110**), ATP (**111**), cAMP (**114**), CMP (**115**), NADH (**119**), *D*-Glucosamin (**143**) und Nitrat (**150**) in Cacodylat-Puffer (0.01 M, pH 7, 25 °C). Die Standardabweichung ist in Form der Fehlerbalken angegeben. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten mit *Origin* erfolgte am Maximum von 303 nm.

Mit Ausnahme der Auswertung der Bindungskonstante für den Komplex mit Substrat **143** (*D*-Glucosamin) liefern beide Programme nahezu identische Werte für die Bindungskonstanten der Komplexe mit Rezeptor **71**. Alle vermessenen Nukleotide werden von Rezeptor **71** in etwa mit der gleichen Stärke mit K -Werten von $3000 - 5100 \text{ M}^{-1}$ gebunden. Somit weist Rezeptor **71** in Bezug auf die vermessenen Nukleotide (AMP, ADP, ATP, cAMP, CMP) keine signifikanten Selektivitäten auf. NADH (**119**) wird mit einer Bindungskonstante von 11600 M^{-1} (*SpecFit*) am stärksten gebunden während Nitrat (**150**) mit einer Bindungsstärke von 3700 M^{-1} schwächer komplexiert wird. Das spannendste Ergebnis liefert die Komplexierung des Zuckers **143** (*D*-Glucosamin). Wie im Stand der Forschung dieser Arbeit bereits beschrieben, stellt die Erkennung von Zuckern in Wasser eine besondere Herausforderung dar und die Bindungskonstanten der wenigen bisher veröffentlichten Kohlenhydratrezeptoren sind in der Regel sehr gering (s. Kapitel 2.3.3). Betrachtet man nochmals einen Ausschnitt des zuvor durchgeführten quantitativen Fluoreszenzscreening, auf dessen Grundlage die Auswahl der qualitativen Bestimmung der Bindungskonstanten getroffen wurde, zeigt sich, dass im Screening *D*-Glucosamin scheinbar kaum oder gar nicht bindet (s. Abbildung 4-91).

Für *D*-Glucosamin wurde nur eine Bestimmung der Bindungskonstante durchgeführt, um eigentlich zu bestätigen, dass keine Komplexierung stattfindet und die scheinbare sehr schwache Bindung im Screening vermutlich im Fehlerbereich liegt und nicht auf eine echte Bindung zurückzuführen ist.

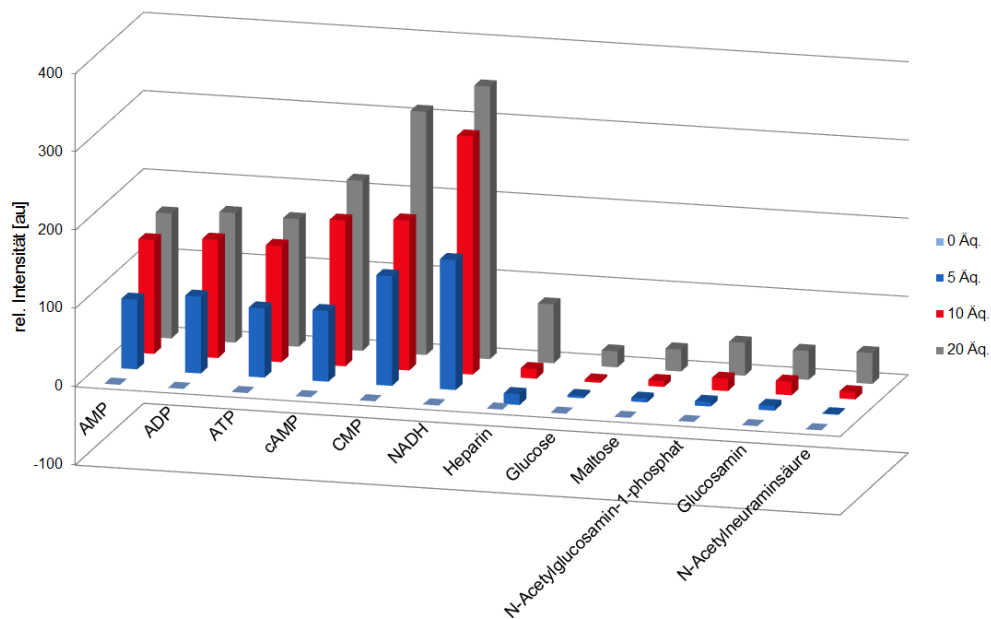


Abbildung 4-91: Ausschnitt des qualitativen Fluoreszenzscreenings des Rezeptors **71** mit den Substraten deren Bindungsstärken bestimmt wurden (AMP (**109**), ADP (**110**), ATP (**111**), cAMP (**114**), CMP (**115**), NADH (**119**), *D*-Glucosamin (**143**), Nitrat (**150**)) und allen Zucker deren relative Intensität, wenn auch nur knapp, über dem Fehler der Messung von 17 au liegt (Heparin (**127**), Glucose (**128**), Maltose (**131**), *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat (**141**), *N*-Acetylneuraminsäure (**145**)). Für das vollständige Screening s. Abbildung 4-83.

Die Auswertung der Daten der Fluoreszenztitration mit *Origin* ergab jedoch für den Komplex des Rezeptors **71** mit Glucosamin eine Bindungsstärke von 2400 M^{-1} . Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die geringe Fluoreszenzänderung während der Titration die Auswertung erschwert bzw. das Ergebnis fehlerbehaftet sein kann (s. Abbildung 4-92).

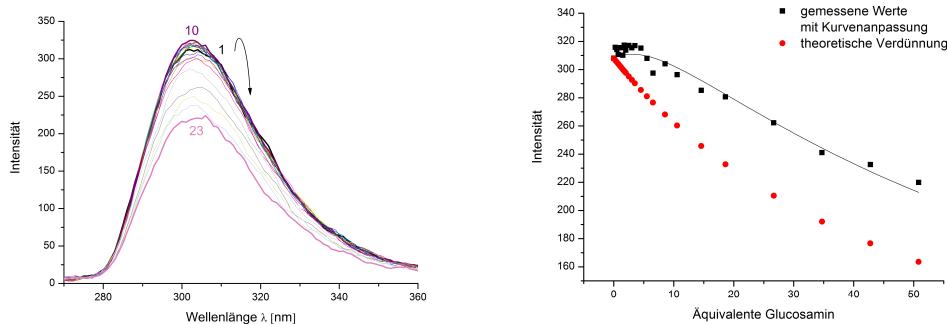


Abbildung 4-92: Links: Zu- und Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 303 nm während der Titration des Rezeptors **71** ($c = 0.02 \text{ mM}$) mit **143** ($c = 1.15 \text{ mM}$) in Cacodylat-Puffer ($c = 10 \text{ mM}$) aufgrund der Komplexbildung. **Rechts:** Zugehörige Bindungsisotherme mit Kurvenanpassung (schwarz) und theoretischer Verdünnung (rot). Die Berechnung der Bindungskonstante von $K = 2400 \text{ M}^{-1}$ erfolgte mit *Origin*.

Die Auswertung der Daten mit dem Programm *SpecFit* lieferte eine Bindungskonstante von 2000 M^{-1} , wobei jedoch die Komplexbildung bei nur 30 % lag und somit für eine optimale Berechnung nicht genug Äquivalente des Substrats zugegeben wurden (s. Abbildung 4-93). Um akkurate Ergebnisse zu bekommen sollte ein Erreichen von 75 % der Sättigungskurve beobachtet werden. Gerade für kleine Bindungskonstanten bedeutet dies, dass bei Titration

wesentlich mehr Äquivalenten zugegeben müssen als es bei einer starken Komplexierung der Fall ist.

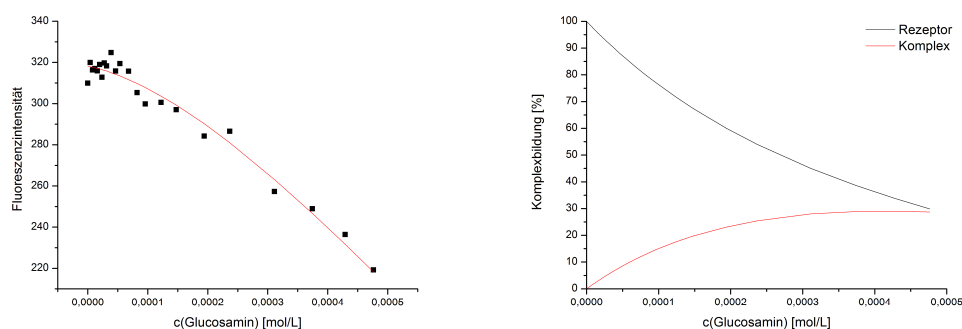


Abbildung 4-93: Links: Gemessene Bindungsisotherme der Titration des Rezeptors **71** ($c = 0.02$ mM) mit **143** ($c = 1.15$ mM) in Cacodylat-Puffer ($c = 10$ mM) mit Kurvenanpassung (rot) mittels *SpecFit*. **Rechts:** Graphische Darstellung der prozentualen Komplexbildung (30 %). Die Berechnung der Bindungskonstante von $K = 2000$ M⁻¹ erfolgte mit *SpecFit*.

Zur Bestimmung einer aussagekräftigeren Bindungskonstante müsste die Messung unter optimierten Bedingungen (Zugabe von mehr Äquivalenten, höherer Startkonzentration des Rezeptors) nochmals wiederholt und sinnvollerweise durch zusätzliche Messmethoden bestätigt werden. Ebenso müssten die Zucker (**127**, **128**, **131**, **141**, **145**) die im quantitativen Screening eine ähnlich schwache Änderung der Intensität hervorrufen wie Glucosamin auf ihre Bindungsstärken hin untersucht werden. Es besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, dass Rezeptors **71** auch diese Zucker bindet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Rezeptor **71** in der Lage ist, Zucker in Wasser zu binden mit vermutlich guten Bindungsstärken im Vergleich mit anderen synthetischen Rezeptoren. Rezeptor **71** wurde mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert und kann daher durch Variation der Aminosäuren synthetisch sehr einfach modifiziert werden um z. B. die Stärke der Komplexierung zu erhöhen oder Substratspezifitäten zu erzielen.

Die Bindungsstudien des Rezeptors **71** mit ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) erfolgte ebenfalls mittels Fluoreszenztitration unter denselben Bedingungen wie auch die zuvor diskutierten Bindungsstudien der biologischen Substrate. Allein die gemessenen Daten wurden durch Kurvenanpassung an die auf der *Scatchard*-Gleichung basierenden Gleichung 4-9 mit dem Datenanalysenprogramms *Statistica 9.0* ausgewertet.

In allen Titrationsexperimenten resultiert die Zugabe von Substrat in einer Abnahme der Emission. Eine signifikante Verschiebung der Emissionsmaxima während der Titration wurde

in keinem Fall beobachtet. Die einzelnen Abbildungen der Titrationsexperimente und ihrer Auswertung befinden sich im Anhang (s. Kapitel 7.1.2).

Die Auswertung der Titrationsdaten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Programm *Statistica 9.0* ergab die in Tabelle 4-11 aufgelisteten und in Abbildung 4-94 graphisch dargestellten Bindungskonstanten, *Scatchard*-Verhältnisse und die hypochromen Effekte H der gebildeten Komplexe des Rezeptors **71** mit dem jeweiligen Substrat. Der hypochrome Effekt H ist ein Maß für die Abnahme der Startintensität I_0 durch die Komplexbildung und kann als Güte für die Titration angesehen werden. Für Werte von $H > 10\%$ ist die Änderung der Intensität signifikant und die gemessenen Datenwerte sind zur Bestimmung der Bindungskonstante geeignet.

	log K	K [M ⁻¹]	n	H [%]
ctDNA	4.65	45140.3	0.11	78.8
p(dAdT) ₂	5.07	117586.4	0.06	76.6
pdA × pdT	4.32	20876.2	0.16	100*
p(dGdC) ₂	5.05	111633.1	0.08	89.6
RNA	5.55	352709.3	0.04	56.3

Tabelle 4-11: Bindungskonstanten (K und log K), das *Scatchard*-Verhältnis n ($n = [RS]/[PN]$) und der hypochrome Effekt H ($H = ((I_0 - I_{lim})/I_0) \cdot 100$) berechnet mit dem Datenanalysen Programm *Statistica 9.0* und Gleichung 4-9 für die Bildung der jeweiligen Komplexe der Substrate ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) mit Rezeptor **71** (Cacodylat-Puffer, 0.01 M, pH 7, 25 °C, c(**71**) = 0.02 mM, c(PN) = 1.15 mM). Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte am Maximum von 303 nm. Alle Werte für K besitzen zufriedenstellende Korrelationskoeffizienten > 0.99 . *) A_{lim} wurde gleich null gesetzt.

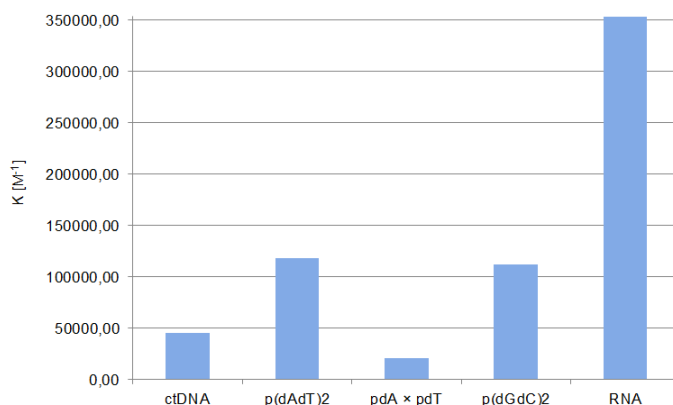


Abbildung 4-94: Graphische Präsentation der mit *Statistica 9.0* und Gleichung 4-9 ermittelten Bindungskonstanten der Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit den Substraten ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) in Cacodylat-Puffer (0.01 M, pH 7, 25 °C, c(**71**) = 0.02 mM, c(PN) = 1.15 mM). Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte am Maximum von 303 nm.

Die ctDNA und pdA × pdT weisen vergleichbare Bindungskonstanten (ctDNA: log K = 4.65; pdA × pdT: log K = 4.32) auf ebenso wie die Polynukleotide p(dAdT)₂ und p(dGdC)₂ (p(dAdT)₂: log K = 5.07; p(dGdC)₂: log K = 5.05). Die einzige Ausnahme bildet die RNA, welche mit Bindungskonstanten von log K = 5.55 ($K = 3.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) am stärksten

gebunden wird. Ursache sind vermutlich die bevorzugt stattfindenden Wechselwirkungen über die in der RNA besser geeignete große Furche. Die große Furche der RNA (A-Form) ist im Vergleich mit großen Furchen anderer DNA-Formen sehr schmal und in etwa vergleichbar mit den kleinen Furchen anderer DNA-Formen (B*-Form). Die Ergebnisse der Bindungsstudien des Rezeptors **71** mit der DNA, RNA und verschiedenen Polynukleotiden als Substrat stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zuvor beschriebenen thermischen Denaturierungsexperimente (s. Abbildung 4-79). Beide Untersuchungsmethoden ergeben für Rezeptor **71** mit RNA (**121**) die größte Stabilisierung bzw. Bindung.

Bindungsstudien zu Rezeptor **86**

Die Bindungsstudien mit Rezeptor **86** wurden in Cacodylat-Puffer (0.01 M) bei 25 °C und pH 7 mit den Nukleotiden Adenosinmonophosphat (AMP, **109**), Adenosindiphosphat (ADP, **110**), Adenosintriphosphat (ATP, **111**), Cytidinmonophosphat (CMP, **115**), NADH (**119**), dem Polysaccharid Heparin (**127**), Phytinsäure (**146**), Nitrat (**150**), ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) durchgeführt (s. Abbildung 4-95).

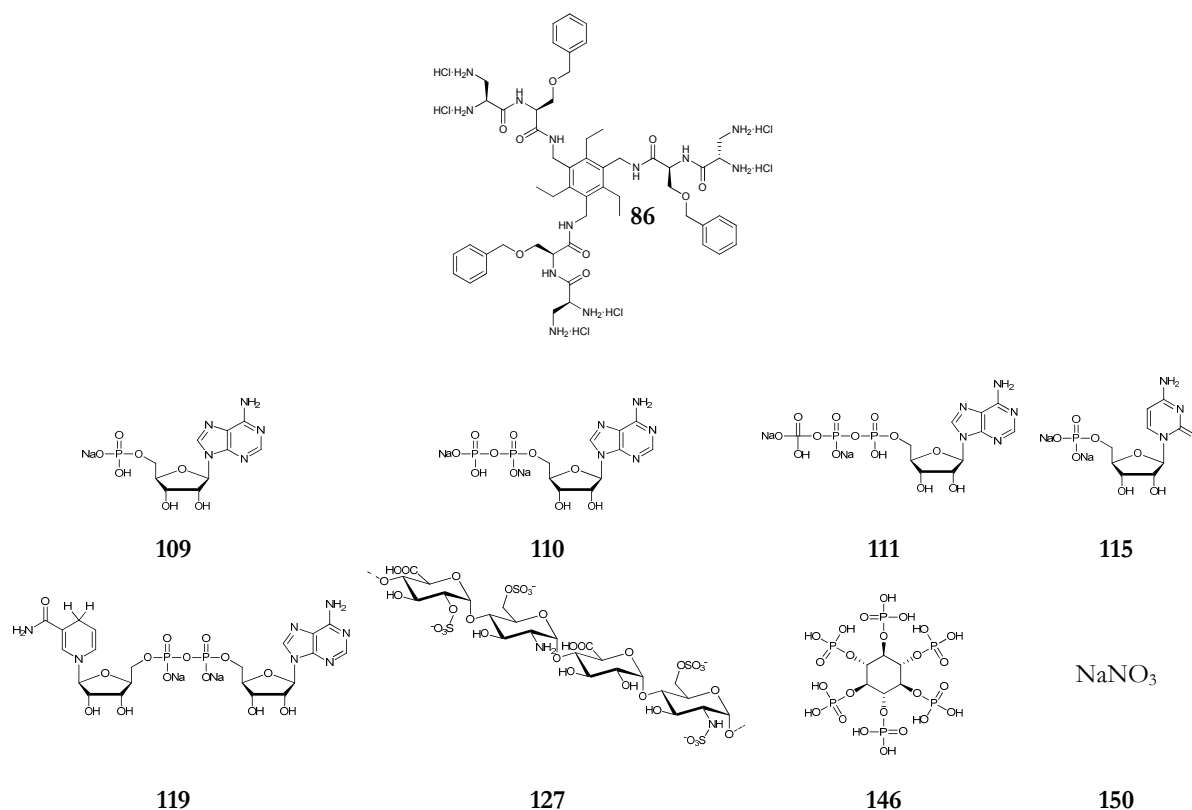


Abbildung 4-95: Substrate der Bindungsstudien mit Rezeptor **86** Adenosinmonophosphat (AMP, **109**), Adenosindiphosphat (ADP, **110**), Adenosintriphosphat (ATP, **111**), , Cytidinmonophosphat (CMP, **115**), NADH (**119**), dem Polysaccharid Heparin (**127**), Phytinsäure (**146**) und Nitrat (**150**).

Die Bestimmung der Komplexstöchiometrie des Rezeptors **86** mit den ausgewählten Substraten **109-111**, **115**, **119**, **146** und **150** mittels *Job*-Plot ergab für alle Komplexe, mit Ausnahme von Phytinsäure (**146**), ein 1:2-Verhältnis von Rezeptor zu Substrat (s. Abbildung 4-96). Im Falle von Phytinsäure weist das Maximum des *Job*-Plots eine eindeutige Abhängigkeit von der ausgewerteten Wellenlänge auf. Dies weist auf komplexere Bindungsmodi hin, so dass der *Job*-Plot in diesem Fall nicht zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie verwendet werden kann. In allen anderen Fällen ist keine eindeutige Abhängigkeit des Maximums von der ausgewerteten Wellenlänge zu erkennen. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal durchgeführt.

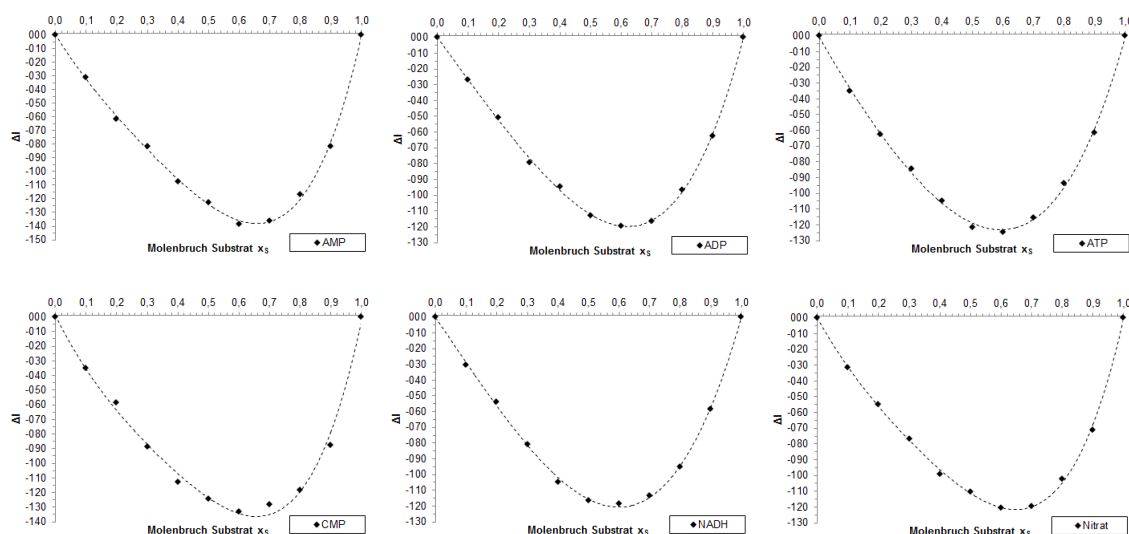


Abbildung 4-96: Die *Job*-Plots der Substrate AMP (**109**), ADP (**110**), ATP (**111**), CMP (**115**), NADH (**119**), Heparin (**127**) und Nitrat (**150**) zeigen, mit Ausnahme von Phytinsäure (**146**), eine 1:2 Komplexstöchiometrie (Rezeptor + 2 Substrate). Die Spektren wurden in Cacodylat-Puffer (0,01 M) bei 25 °C, pH 7 und einer Gesamtkonzentration von $[R] + [S] = 40 \mu\text{M}$ aufgenommen. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mit den Intensitätswerten am Emissionsmaximum von 302 nm. Über dem Molenbruch des jeweiligen Substrats wurde $\Delta I = I_{\text{obs}} - I_R - I_S$ aufgetragen.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurden wie auch im Fall des Rezeptors **71** Fluoreszenz-Titrationsexperimente für alle Substrate in Cacodylat-Puffer, bei pH 7 und 25 °C durchgeführt. Die Titration erfolgte durch Zugabe von Aliquoten zunehmenden Volumens einer Stammlösung des jeweiligen Substrats ($[S] = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) zu einer Lösung des Rezeptors (Mikroküvette, 800 μl , $[R] = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Nach jeder Substratzugabe wurde nach einer Inkubationszeit von 3 min das Emissionsspektrum von 220 - 400 nm nach Einstrahlung einer Anregungswellenlänge von 220 nm aufgenommen. In den Titrationsexperimenten mit den Substraten AMP, ADP, ATP und Nitrat resultiert die Zugabe von Substrat in einer starken Abnahme der Emission. Während bei Phytinsäure die Zugabe des Substrats eine leichte Zunahme der Emission verursacht. Im Falle der Substrate CMP und NADH kommt es während der Titration zunächst zu einer starken Abnahme der Emission. Nach etwa der elften

Zugabe, die drei Äquivalenten des Substrats entspricht, resultiert die Zugabe von weiteren Aliquoten Substrat in einer geringen Zunahme der Emission (s. Abbildung 4-97).

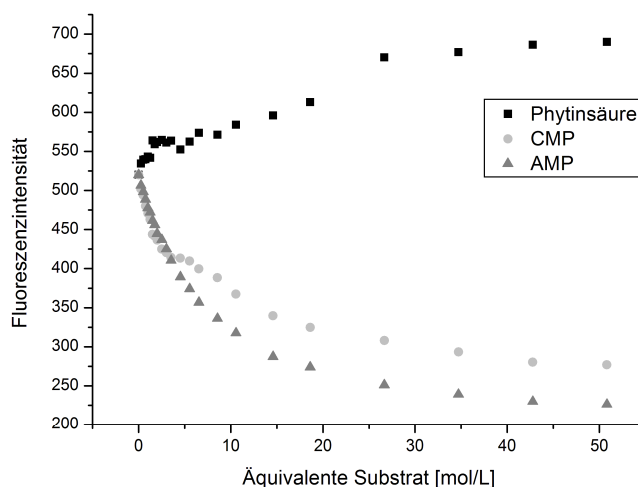


Abbildung 4-97: Bindungsisothermen der Titrationsexperimente des Rezeptors **86** mit den Substraten AMP (▲), CMP (●) und Phytinsäure (■). Die Zugabe von AMP verursacht eine starke Emissionsabnahme, während die Zugabe von Phytinsäure in einer leichten Zunahme der Emission resultiert. Im Fall von CMP wird nach Zugabe von drei Äquivalenten Substrat die Emissionsabnahme von einer leichten Zunahme unterbrochen.

Eine signifikante Verschiebung der Emissionsmaxima während der Titration wurde in keinem Fall beobachtet. Die einzelnen Abbildungen der Titrationsexperimente sich im Anhang (s. Kapitel 7.1.2).

Die Auswertung der Titrationsdaten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Programm *SpecFit* stellte sich nicht als so einfach und klar heraus wie im Fall des Rezeptors **71**. Die *Job*-Plots ergaben zwar eine Komplexstöchiometrie von 1:2 von Rezeptor zu Substrat, allerdings ergab die Auswertung der Messdaten mit *SpecFit* im Fall der Substrate AMP (**109**), ADP (**110**), ATP (**111**), und Nitrat (**150**) einen optimalen Fit unter der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie als auch für ADP (**110**), ATP (**111**), und Nitrat (**150**) unter der Annahme einer 1:1 + 1:2 bzw. 1:1 + 1:3 Komplexstöchiometrie. Die Annahme eines 1:1-Komplexes steht jedoch eindeutig im Widerspruch zu den Ergebnissen der *Job*-Plots. Für die Substrate CMP (**115**), NADH (**119**) und Phytinsäure (**146**) lässt sich kein optimaler Fit ermitteln.

Die Auswertung der Titrationsdaten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Programm *SpecFit* unter Annahme von 1:1-, 1:1 + 1:2 bzw. 1:1 + 1:3 Komplexen ergab die in Tabelle 4-12 aufgelisteten Bindungskonstanten der gebildeten Komplexe des Rezeptors **86** mit dem jeweiligen Substrat. Da das Bindungsverhalten sehr komplex bzw. nicht eindeutig ist, ist kein direkter Vergleich der Bindungskonstanten möglich. Es kann nur geschlussfolgert werden, dass Rezeptor **86** die Substrate bindet. Der Grund für das vermutlich komplexere Bindungsverhalten im Vergleich mit dem zuvor diskutierten Rezeptor **71** könnte daran liegen, dass die Arme des Rezeptor **86** nur aus zwei Aminosäuren aufgebaut sind und dass **86**

sechsfach geladen ist. Sowohl die kürzeren Arme als auch die große Anzahl an Ladungen könnte dafür verantwortlich sein, dass der Rezeptor keine wohldefinierte präorganisierte Kavität formt und daher nicht nur ein Substrat gebunden wird.

Substrat	$\log K_1$	σ	$\log K_2$ ($\log K_3$)	σ	Komplexstöchiometrie (Rezeptor zu Substrat)
AMP 109	3.81	0.01	-	-	1:1*
ADP 110	4.01	0.02	-	-	1:1*
ATP 111	3.83	0.03	-	-	1:1*
Nitrat 150	3.94	0.03	-	-	1:1*
ADP 110	3.88	0.10	3.41	0.07	1:1 + 1:3
ATP 111	4.39	0.34	3.58	0.17	1:1 + 1:2
Nitrat 150	3.82	0.15	3.46	0.07	1:1 + 1:3

Tabelle 4-12: Bindungskonstanten (K und $\log K$, gerundete Werte) und die entsprechende Standardabweichung σ berechnet mit dem Programm *SpecFit* für die Bildung der jeweiligen Komplexe mit Rezeptor **86**. Für die Substrate CMP (**115**), NADH (**119**) und Heparin (**127**) lässt sich mit dem Programm *SpecFit* und den gemessenen Werten der Titration kein optimaler Fit ermitteln. *) Komplexstöchiometrie steht in Widerspruch zum *Job*-Plot, liefert aber sinnvolle Werte und einen guten Fit.

Die Bindungsstudien des Rezeptors **86** mit Heparin (**127**), ctDNA (**120**), RNA (**121**) und den Polynukleotiden p(dAdT)₂ (**122**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) erfolgte ebenfalls mittels Fluoreszenztitration unter denselben Bedingungen wie auch die zuvor diskutierten Bindungsstudien der biologischen Substrate. Allein die gemessenen Daten wurden durch Kurvenanpassung an die auf der *Scatchard*-Gleichung basierenden Gleichung 4-9 mit dem Datenanalysenprogramms *Statistica 9.0* ausgewertet.

In den Titrationsexperimenten resultiert die Zugabe der Substrate Heparin (**127**) und p(dAdT)₂ (**122**) in einer starken Abnahme der Emission, während die Zugabe der Substrate ctDNA (**120**), RNA (**121**), pdA × pdT (**123**) und p(dGdC)₂ (**124**) in eine starken Zunahme gefolgt von einer Abnahme resultiert (s. Abbildung 4-98).

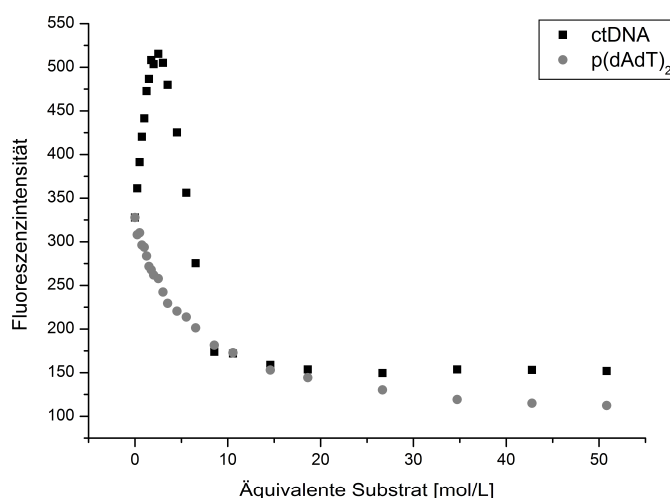


Abbildung 4-98: Bindungsisothermen der Titrationsexperimente des Rezeptors **86** mit den Substraten ctDNA (**120**, ■) und p(dAdT)₂ (**122**, ●).

Eine signifikante Verschiebung der Emissionsmaxima während der Titration wurde in keinem Fall beobachtet. Die Auswertung der Titrationsdaten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit dem Programm *Statistica 9.0* ergab, mit Ausnahme von Substrat $p(dAdT)_2$ (**122**), keine aussagekräftigen Bindungskonstanten, da die Korrelationskoeffizienten zwischen 0.48 und 0.94 liegen und damit die Qualität des Fits nicht ausreichend ist. Die Bindungskonstante für Substrat $p(dAdT)_2$ (**122**) beträgt 2600 M^{-1} ($\log K = 3.41$, $n = 1.70$, $H = 90 \%$). Im Falle der anderen vermessenen Substrate liegt die Vermutung nahe, dass die Wechselwirkung des Rezeptors **86** mit den verschiedenen Makromolekülen ein komplexeres Bindungsverhalten bedingen wie z. B. kooperatives oder spezifisches Binden oder auch Kombinationen aus mehreren Bindungsmodi und daher keine Bindungskonstante bestimmt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Rezeptoren ausgewählte biologische Substrate binden. Im Falle des Rezeptors **86** lassen sich die Bindungsstärken aufgrund komplexen Bindungsverhaltens nicht genauer quantifizieren. Rezeptor **71** bindet sowohl Nukleotide als auch Polynukleotide und besitzt großes Potential auch Zucker in Wasser zu erkennen.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es ein allgemeines biomimetisches Konzept bzw. Design für Rezeptoren zu entwerfen, die in der Lage sind, ausgewählte biologische Substrate, auf Grundlage der in natürlichen Bindungsstellen vorkommenden Prinzipien, zu binden. Das entwickelte Rezeptorkonzept ist nicht nur für ein einziges Substrat oder eine Substratgruppe maßgeschneidert. Vielmehr verwirklichen Konzept und Synthesestrategie eine einfache strukturelle Anpassung des Rezeptors an verschiedene Substrate, durch den Austausch oder Einbau unterschiedlicher bindender funktioneller Gruppen. Nach der Entwicklung der Synthesestrategie und synthetischer Realisierung wurde eine Einschätzung des Potentials des Rezeptorkonzepts durch erste Bindungsstudien mit ausgewählten Substraten - Polynukleotiden, Nukleotiden und Zuckern - vorgenommen. Derartige Rezeptorsysteme ermöglichen ein besseres Verständnis der entscheidenden Wechselwirkungen, die eine Rolle bei der Erkennung spielen, und der biologischen Erkennungsprozesse im Allgemeinen. Diese neuen Erkenntnisse können die Entwicklung von Medikamenten ermöglichen oder Hinweise für die Entwicklung medizinischer Therapieansätze liefern.

Die biomimetische Nachahmung natürlicher präorganisierter Bindungsstellen wurde durch die Verknüpfung ausgewählter Aminosäuren mit Templat **55** für Synthesen in Lösung und mit Templat **57** für die Festphasenpeptidsynthese umgesetzt (s. Abbildung 5-1).

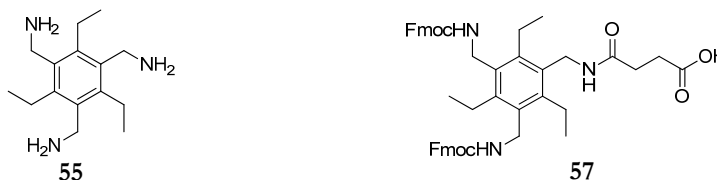


Abbildung 5-1: Strukturen der Template **55** und **57** für die Synthesen der Rezeptoren in Lösung und an der festen Phase.

Beide Template konnten nach Entwicklung entsprechender Synthesestrategien erfolgreich synthetisiert und ihre Synthesen optimiert werden. Ebenso konnten die Synthesen der Rezeptoren in Lösung und an der Festphase nach einigen Methodenoptimierungen erfolgreich durchgeführt werden. Die Bedingungen für die Festphasensynthese des Rezeptors **71** konnten durch die Wahl des Harzes, der Kupplungs- und Synthesebedingungen soweit optimiert

werden, dass der gewünschte Rezeptor in guten Reinheiten und Ausbeuten synthetisiert werden kann. Entscheidend für das Gelingen der Synthese waren die Verwendung des Polyethylen-basierten Harzes (NovaPEG), der Einsatz der Mikrowellentechnik (96 °C, 20 W, 20 min) und die Verwendung der Kupplungsreagenzien DIC und Cl-HOBt. Wobei bei der Kupplung der jeweiligen Aminosäuren bzw. Bausteine nicht die Anzahl der Äquivalente allein entscheidend ist sondern auch die Konzentration der Reagenzien, die mindestens $0.18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pro freiem Amin betrug. Ein weiterer entscheidender Punkt war die Erhöhung des Volumens der Reaktionslösung während der Kupplung des Tyrosins bei gleichbleibender Konzentration. Die Erhöhung des Lösemittelvolumens verhindert die Verminderung des Lösemittels aufgrund des ungewöhnlich starken Quellens des Harzes. Somit konnte schließlich die entwickelte Synthesestrategie an der Festphase, trotz des Schwierigkeitsgrades der Synthese aufgrund der verzweigten Struktur und dem möglichen Aggregationsverhalten, erfolgreich optimiert, synthetisch umgesetzt und der potentielle Rezeptor **71** synthetisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es ebenso erfolgreich gelungen nach entsprechenden Syntheseoptimierungen neben den an der Festphase synthetisierten Rezeptoren (**71-73**) auch in Lösung die symmetrischen Rezeptoren (**75, 80, 85, 87, 89**) und die unsymmetrischen Rezeptoren (**90, 91, 99-103**) zu synthetisieren. Zunächst auftretende Probleme wie Epimerisierung oder moderate Ausbeuten wurden durch Syntheseoptimierungen oder auch die Entwicklung alternativer Syntheserouten mit Erfolg gelöst. Abbildung 5-2 zeigt zusammenfassend die ein- bis dreiarmigen Rezeptoren, die in Lösung (**75, 80, 85, 87, 89-91, 99-103**) und an der Festphase (**71-73**) synthetisiert wurden.

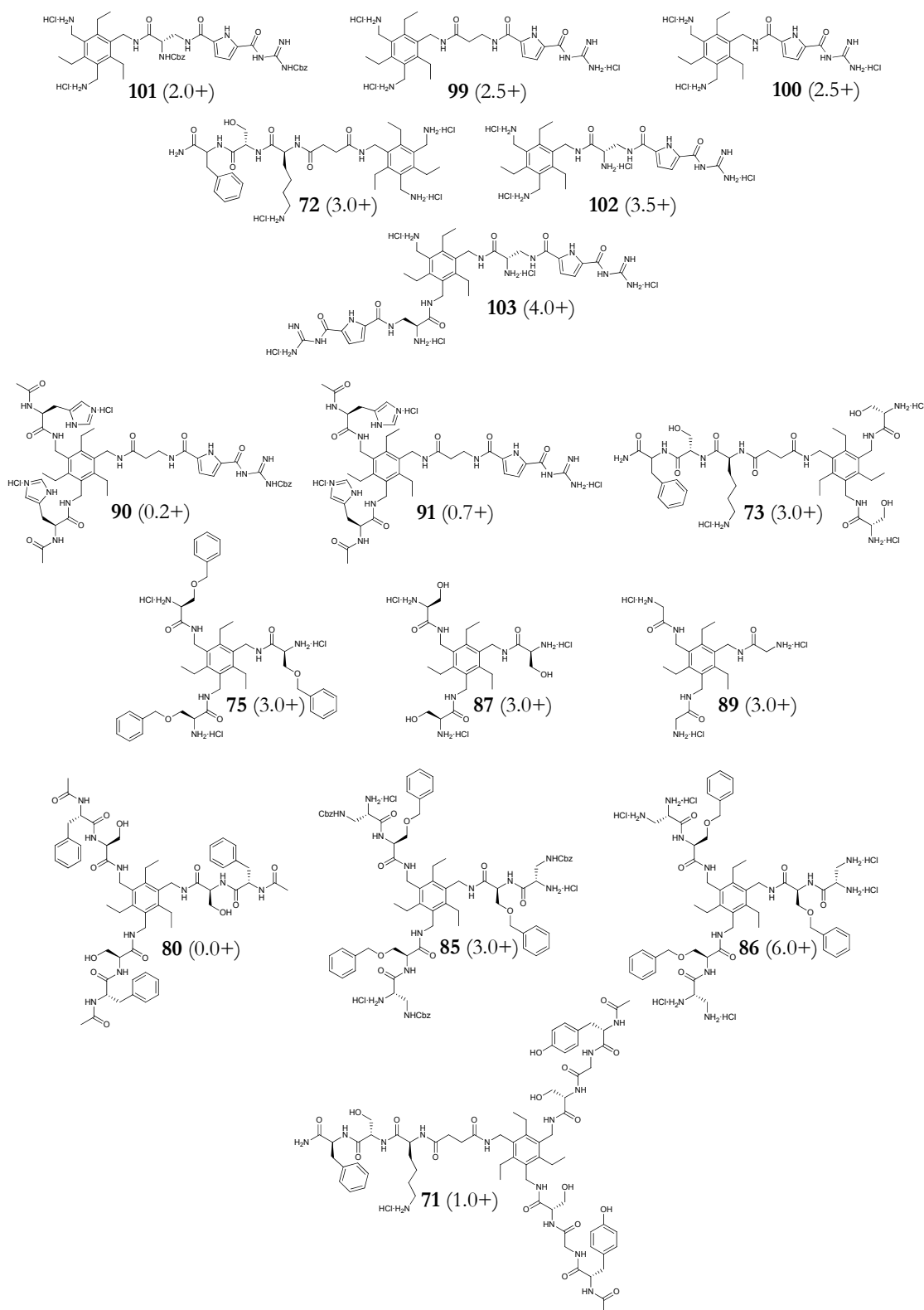


Abbildung 5-2: Strukturen der Rezeptoren **71-73**, **75**, **80**, **85**, **87**, **89-91**, und **99-103**. Die Angabe in Klammern bezieht sich auf die Anzahl der Ladungen bei pH 7. Die Rezeptoren wurden nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit, d. h. nach der Anzahl ihrer Arme bzw. nach Anzahl der Aminosäuren innerhalb der Arme und innerhalb dieser Sortierung nach der Anzahl der Ladungen angeordnet. Die Rezeptoren **80** und **85** sind nicht wasserlöslich und konnten daher nicht auf ihr Potential hin untersucht werden.

Zur Einschätzung des Potentials der Rezeptoren, die ausgewählten biologisch relevanten Substrate zu binden, wurden verschiedene Studien durchgeführt. Die Untersuchung der

Bindungseigenschaften der Rezeptoren gegenüber den ausgesuchten Substrate – DNA, Polynukleotide, Nukleotide und Zucker – erfolgte mit Hilfe der Methode der Fluoreszenzspektroskopie im Falle der Polynukleotide zusätzlich mit Hilfe thermischer Denaturierungsexperimente.

Alle synthetisierten symmetrischen (drei identische Rezeptorarme) bzw. unsymmetrischen (verschiedene Rezeptorarme) ein- bis dreiarmligen Rezeptoren, mit Ausnahme der wasserunlöslichen Rezeptoren **80** und **85**, wurden auf ihr Bindungsverhalten gegenüber ctDNA mittels thermischen Denaturierungsexperimenten untersucht.

Allgemein lässt sich festhalten, dass mit wenigen Ausnahmen, alle Rezeptoren die DNA binden und dadurch die Doppelhelixstruktur stabilisieren. Die Unterschiede in den Bindungseigenschaften korrelieren im Wesentlichen mit dem Ladungszustand der Rezeptoren: je höher die Ladung des Rezeptors ist, desto größer ist die Stabilisierung der DNA. Die auffälligste Ausnahme unter allen Rezeptoren bildet Rezeptor **71**. Trotz nur einer positiven Ladung stabilisiert **71** die DNA verhältnismäßig gut. Dies lässt vermuten, dass neben ionischen Wechselwirkungen weitere, bindende nicht-kovalente Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen bzw. Rezeptor **71** eine optimale Passform besitzt, die sich gut in die kleine DNA-Furche einfügt.

Die vier besten Rezeptoren **102**, **100**, **72** und **71** (s. Abbildung 5-3) stabilisieren die ctDNA am stärksten und wurden in weiteren Denaturierungsexperimenten zusätzlich auf ihr Stabilisierungsvermögen gegenüber verschiedenen künstlichen Polynukleotiden (pdA × pdT, p(dAdT)₂, pA × pU) untersucht (s. Tabelle 4-7 Kapitel 4.3.1.2).

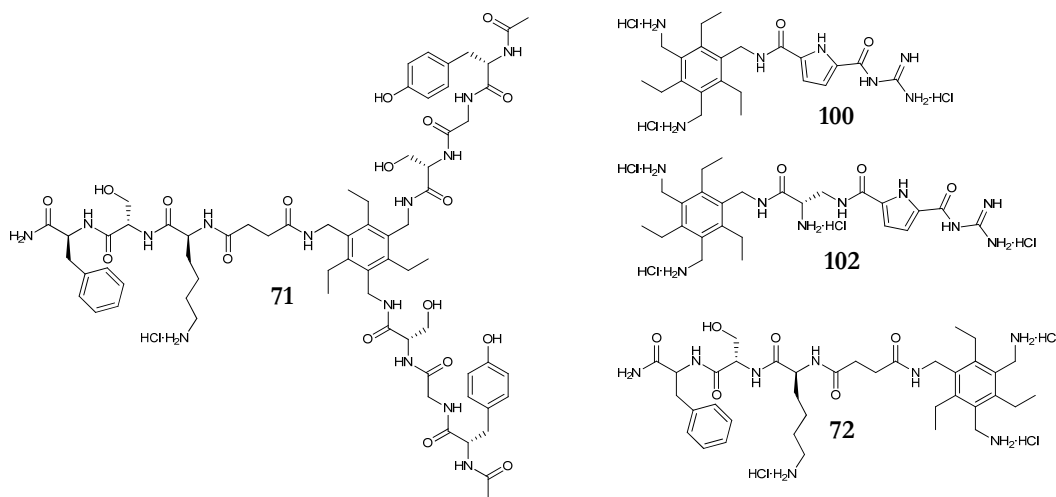


Abbildung 5-3: Struktur der Rezeptoren **71**, **72**, **100** und **102**.

Allgemein wird eine Präferenz für AT-reiche Sequenzen und für die RNA beobachtet. Dies deutet auf eine bevorzugte Bindung der Rezeptoren in sehr schmalen Furchen hin, konkret also in die sehr schmale kleine Furche der AT-reichen Sequenzen bzw. in die sehr schmale große

Furche der RNA. Rezeptor **102** stabilisiert unter den vier ausgewählten Rezeptoren alle Polynukleotide am stärksten und bindet die RNA. Die Rezeptoren **100** und **72** stabilisieren bevorzugt AT-reiche Polynukleotide. Rezeptor **71** ist unter den vier genauer untersuchten Rezeptoren derjenige, der die geringsten Stabilisierungswerte liefert. Trotz der geringeren Stabilisierung der Polynukleotide, zeigt **71** eine eindeutige Präferenz gegenüber der RNA.

Für weitere Bindungsstudien mit Nukleotiden, Polynukleotiden und Zuckern wurden die Rezeptoren **71** und **86** ausgewählt (s. Abbildung 5-4).

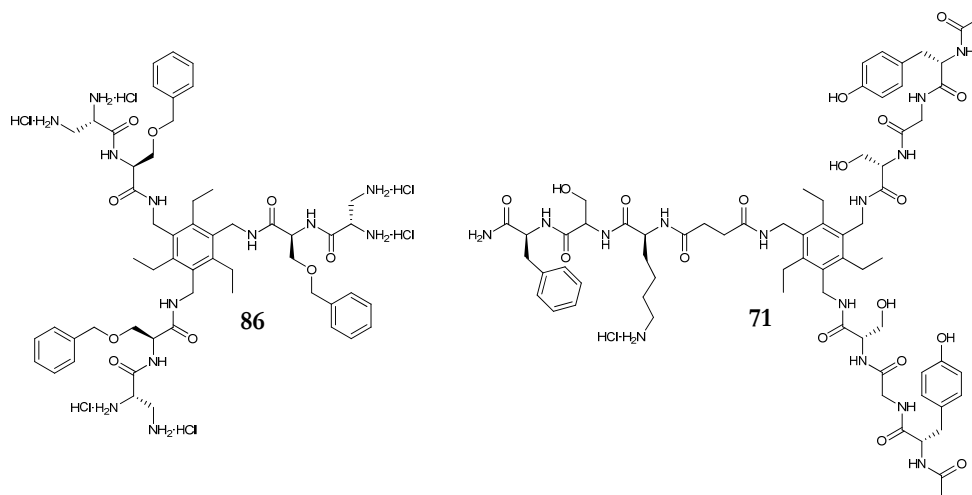


Abbildung 5-4: Strukturen der Rezeptoren **71** und **86**, die für qualitative Bindungsstudien mit Nukleotiden, Polynukleotiden und Zuckern ausgewählt wurden.

Beide Rezeptoren sind unter den synthetisierten Rezeptoren diejenigen, die jeweils drei Arme, bestehend aus zwei bzw. drei Aminosäuren, besitzen und so am wahrscheinlichsten in der Lage sind wohldefinierte, das Substrat umschließende Kavitäten zu bilden. Um unter den 43 ausgewählten Substraten mit einem möglichst einfachen und effizienten Verfahren die Substrate, die gebunden werden, ausfindig zu machen, wurde ein schnelles, quantitatives Fluoreszenzscreeningverfahren angewendet. Im Anschluss wurden für die sich aus dem Screening ergebenden Substrate in Fluoreszenztitrationsexperimenten die Bindungsstärken bestimmt. Das Bindungsverhalten des Rezeptors **86** erwies sich als sehr komplex. Da keine eindeutige Bindungsstöchiometrie bestimmt werden konnte, war es auch nicht möglich aussagekräftige Bindungskonstanten zu ermitteln. Rezeptor **71** hingegen bindet die ausgewählten Substrate, mit Ausnahme der Polynukleotide, in 1:1-Komplexen (s. Tabelle 4-10 Kapitel 4.3.3.2). Die ausgewählten Nukleotide (AMP, ADP, ATP, cAMP, CMP) werden mit ähnlichen K-Werten gebunden. Somit weist Rezeptor **71** in Bezug auf die vermessenen Nukleotide keine signifikanten Selektivitäten auf. NADH (**119**) wird am stärksten gebunden, während Nitrat (**150**) schwächer komplexiert wird. Ebenso wurden die Bindungskonstanten des Rezeptors **71** mit den verschiedenen Polynukleotiden bestimmt (s. Tabelle 4-11 Kapitel 4.3.3.2).

Die ctDNA und pdA × pdT weisen vergleichbare Bindungskonstanten auf ebenso wie die Polynukleotide p(dAdT)₂, und p(dGdC)₂. Die einzige Ausnahme bildet die RNA, welche am stärksten gebunden wird. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Ergebnissen der thermischen Denaturierungsexperimente. Neben Nukleotiden und Polynukleotiden bindet Rezeptor **71** auch einen Zucker (Glucosamin **143**). Glucosamin wird mit $K = 2400 \text{ M}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung wie die bisher effektivsten literaturbekannten Kohlenhydratrezeptoren gebunden. Die Ergebnisse sowohl des Fluoreszenzscreenings als auch der Fluoreszenztitration von Glucosamin lassen vermuten, dass auch weitere Zucker (Heparin **127**, Glucose **128**, Maltose **131**, *N*-Acetyl-*D*-Glucosamin-1-phosphat **141**, *N*-Acetylneuraminsäure **145**) von Rezeptors **71** gebunden werden könnten. In zukünftigen Bindungsstudien müssten die Bindungskonstanten bestimmt werden, um diese Vermutung bestätigen zu können. Weiter müssen die durchgeführten Bestimmungen der Bindungskonstanten wiederholt und durch alternative Messmethoden, z. B. ITC-Messungen oder im Falle der Polynukleotide CD-Spektroskopiemessungen, bestätigt werden.

5.2 Ausblick

Um die bisherigen Rezeptoren für weitere Messungen bezüglich Bindungsstärke und Selektivität weiter zu optimieren, bieten sich verschiedene Möglichkeiten. Zur Erkennung der DNA bzw. der verschiedenen Polynukleotide haben sich die Rezeptoren **71**, **72**, **100** und **102** als die besten erwiesen (s. Abbildung 5-3). Die Rezeptoren **71** und **72** wurden beide an der Festphase synthetisiert. Die Festphasenpeptidchemie stellt eine geeignete Methode zur Variation der Rezeptoren dar. Auf diesem Weg könnten durch Variation der Aminosäuren z. B. der Einfluss der Aminosäure Serin, direkt mit dem Triamin-Templat verbunden, weiter untersucht werden. Ebenso kann auf diesem Weg Rezeptor **71** verändert werden und weiter auf sein Bindungsvermögen gegenüber Kohlenhydraten im Hinblick auf verbesserte Bindungsaffinitäten oder Substratselektivitäten untersucht werden. Um Rezeptor **86** so zu optimieren, dass definiertere Komplexe gebildet werden und so die Bindung zu den ausgewählten Substraten weiter untersucht werden kann, gibt es zwei Möglichkeiten (s. Abbildung 5-5).

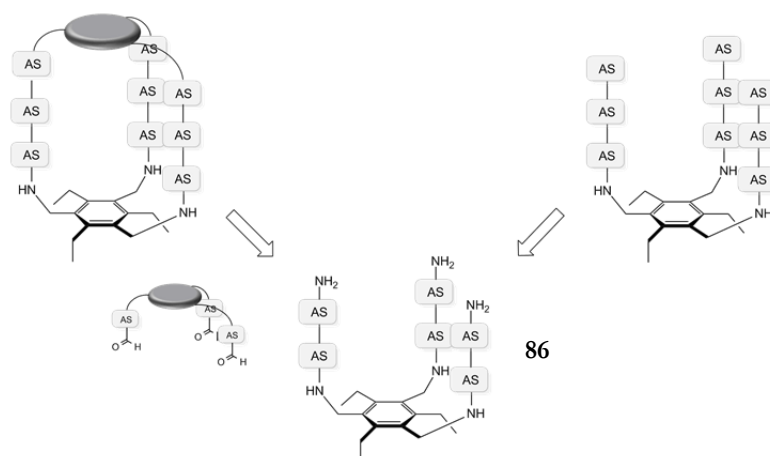


Abbildung 5-5: Retrosynthetische Darstellung der zwei Möglichkeiten zur Optimierung des Rezeptors **86**.

Die eine Möglichkeit wäre die Verlängerung der Arme durch Kupplung einer weiteren Aminosäure z. B. Phenylalanin oder Tryptophan. Die zweite Möglichkeit wäre die Kupplung eines Deckels, um einen geschlossenen käfigartigen Rezeptor zu erhalten. Beide Wege ergeben Rezeptoren, die definiertere Kavitäten als Rezeptor **86** bilden können. Die Einführung eines solchen Deckels erfordert allerdings die Berücksichtigung einiger Bedingungen. Da beide Verbindungen für eine vollständige Cyclisierung je dreimal miteinander reagieren müssen, bietet es sich an unter sehr verdünnten Bedingungen zu arbeiten um die Bildung von Nebenprodukten zu minimieren. Zusätzlich wäre es der Bildung des gewünschten Produkts dienlich, die Verknüpfung beider Verbindungen nicht durch Knüpfung einer Peptidbindung sondern mittels einer Gleichgewichtsreaktion durchzuführen und die Cyclisierung durch Zugabe eines mittels nicht-kovalenten Wechselwirkungen bindenden und vororganisierenden Templat zu unterstützen. Eine mögliche Gleichgewichtsreaktion ist die Iminreaktion, bei der Aldehyd und Amin zunächst zum Imin reagieren. Durch nachfolgende Reduktion zum sekundären Amin könnte das gewünschte Produkt isoliert werden (s. Abbildung 5-6).

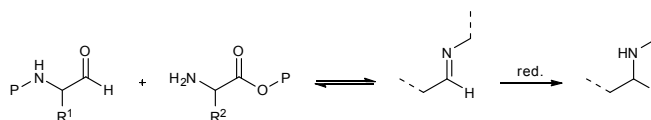


Abbildung 5-6: Iminreaktion mit nachfolgender Reduktion zum sekundären Amin.

Als mögliche Template für die Templat-basierte Cyclisierung eignen sich aromatische Template, die in der Lage sind π - π -Wechselwirkungen sowohl mit dem aromatischen Boden als auch dem aromatischen Deckel, der beiden Edukte einzugehen. Ebenso von Vorteil sind Wasserstoffbrücken zwischen den Armen des Rezeptors und dem potentiellen Templat. Im Rahmen der Arbeit durchgeführte computergestützte Rechnungen zeigen, dass sich sowohl Trisäure **151** als auch Templat **152** zur Templat-basierten Cyclisierung eignen könnten (s. Abbildung 5-7).

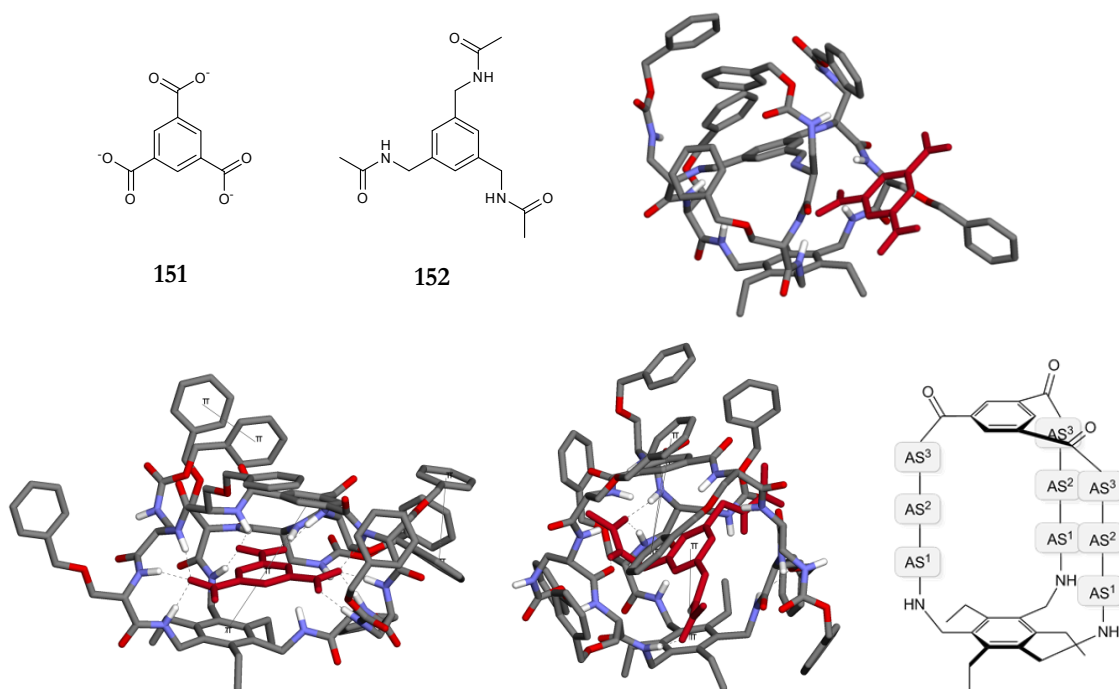


Abbildung 5-7: Computergestützte Kraftfeldrechnungen (OPLS 2005 Kraftfeld in Wasser, 10000 Rechencyklen) ergeben, dass sich Trisäure **151** (unten links) und auch Templat **152** (unten Mitte) zur Templat-basierten Cyclisierung eignen, als auch, dass die verbrückenden Arme des cyclischen Rezeptors aus drei Aminosäuren aufgebaut sein müssen (oben rechts). Wasserstoff-Brückenbindungen sind gestrichelt dargestellt während π -Wechselwirkungen mit durchgezogenen Linien gekennzeichnet sind. Der für die Berechnungen verwendete Modellrezeptor ist unten rechts abgebildet (AS¹ = Ser(Bzl), AS² = Azaserin(Cbz), AS³ = Ser(Bzl)). Der Modellrezeptor mit nur zwei Aminosäuren pro Arm ist entsprechend aus den Aminosäuren mit den Resten AS¹ und AS² aufgebaut.

Beide Template bilden π - π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Bereichen des cyclischen Rezeptors ebenso wie Wasserstoff-Brückenbindungen zu den Seitenketten bzw. dem Peptidrückgrad der verbrückenden Arme. Beide Template könnten somit durch ihre Wechselwirkungen Boden und Deckel vororganisieren und die Cyclisierung begünstigen. Weiter ergaben die Rechnungen, dass der käfigförmige Rezeptor eine Mindestgröße benötigt, die durch drei Aminosäuren in den verbrückenden Armen erreicht wird (s. Abbildung 5-7).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist ein biomimetisches Konzept, welches auf biologisch ausgewählte Substrate zugeschnitten ist, zu entwerfen, dieses synthetisch an der Festphase und in Lösung umzusetzen und in Bindungsstudien das Potential der synthetisierten Rezeptoren zur Bindung von Nukleotiden, Polynukleotiden und insbesondere Kohlenhydraten nachzuweisen. Speziell Rezeptor **71** hat sich als besonders interessant und effektiv erwiesen sowohl als Rezeptor für die DNA und Polynukleotide als auch für die Erkennung von Zuckern in Wasser.

6. EXPERIMENTALTEIL

6.1 Allgemeine experimentelle und analytische Methoden

Lösemittel und Reagenzien

Alle verwendeten Lösemittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösemittel wurden wie folgt erhalten: Tetrahydrofuran und Diethylether durch Erhitzen unter Rückfluss über Natrium mit Benzophenon als Indikator und anschließende Destillation; Dichlormethan durch Erhitzen unter Rückfluss über Calciumhydrid und anschließende Destillation; Methanol durch Erhitzen unter Rückfluss über Magnesiumspänen und Iod und anschließendes destillatives Entfernen; Methanol für die MPLC wurde mit einem ILUDEST MICROPURE Destillationssystem destilliert; DMF durch Erhitzen unter Rückfluss über Calciumhydrid unter vermindertem Druck und anschließende Destillation, dabei wurden etwa 20 Volumenprozent Vorfraktion verworfen; Hochreines Wasser für die Chromatographie und spektroskopische Messungen wurde mittels eines TKA MicroPure Ultrapure Wasseraufbereitungssystems erhalten. Alle anderen Lösemittel wurden, insofern nicht anders angegeben, wie geliefert ohne weitere Reinigung verwendet. Die für die NMR-Spektroskopie benötigten deuterierten Lösemittel, CDCl_3 und DMSO_{d6} , wurden von der Firma Deutero bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich, soweit nicht anders vermerkt um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Merck*, *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Lancaster*, *GL Biochem*, *Aldrich*, *Acros Organics* oder *Alfa Aesar*, die ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden.

Rotationsverdampfer

Geräte: Heidolph Laborota 4000 efficient und HB digital Wasserbad

Destillatives Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde mittels Rotationsverdampfung bei 40 °C und dem erforderlichen Druck in Abhängigkeit des verwendeten Lösemittels durchgeführt.

Schutzgas

Als Schutzgas wurde Stickstoff 99.996 % oder Argon 99.998 % der Firma Linde verwendet, welches zuvor über Calciumchlorid und Orangegel getrocknet wurde.

Vakuumpumpen

- Geräte:
- Vacuubrand PC2002 Vario mit CVC 2000, MD1C
 - Vacuubrand Drehkolbenvakuumpumpe RZ5

Lyophilisation

Gerät: Christ Alpha 1-4 LD plus Gefriertrockner

Die Gefriertrocknung von Feststoffen wurde mit hochreinem Wasser mit einem Christ Alpha 1-4 LD plus Gefriertrockner durchgeführt. Wenn notwendig wurden die Feststoffe zuvor in geringen Mengen Methanol gelöst.

Schmelzpunktbestimmung (Smp.)

- Gerät:
- Schmelzpunktbestimmungsapparatur SMP 20 nach Dr. Tottoli
 - Melting Point B-450 der Firma *Büchi*

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur SMP 20 nach Dr. Tottoli oder an einem Melting Point B-450 Gerät der Firma *Büchi* bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

pH-Messungen

Gerät: Knick pH-Meter 766 Calimatic

Die pH-Elektrode wurde mit kommerziell erhältlichen Pufferstandards kalibriert (pH = 4.00 und pH = 7.00)

Dünnschichtchromatographie (DC)

Gerät: Benda Nu-4 KL UV Lampe (Wellenlängen: 254 nm, 366 nm)

Material: Macherey-Nagel POLYGRAM SIL/UV254

Die Reaktionen wurden mittels DC auf Silica Gel beschichteten Platten (Schichtdicke: 0.2 mm) überwacht. Die Visualisierung wurde durch Fluoreszenzlöschung mit einer 254 nm UV-Lampe ermöglicht. Alternativ konnten die Substanzen durch Anfärben in der Iodkammer oder durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung (90 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure, 500 mg Ninhydrin, 1 ml Trifluoressigsäure) detektiert werden. Laufmittelgemische werden, soweit nicht anders vermerkt, in Volumenteilen (v/v) angegeben.

Medium Performance Liquid Chromatography (MPLC), Normal-Phase, Präparativ

Geräte: Kronlab KD50/100 SS Pumpe; Kronlab UV/Vis 2.5 Detektor

Säule: Kronlab Labormaßstab, Glassäule ECOPLUS, TAC25/500LS0-SR-2

Material: Macherey Nagel Silica Gel 60M für Chromatographie, 0.04–0.063, 230–400 mesh ASTM

Die Normalphasenflashchromatographie wurde mittels Vakuum gepackter Silica Kronlab Glassäulen (Durchmesser: 25 mm; Länge 250–500 mm) durchgeführt. Alle Lösemittel wurden vor Gebrauch destilliert. Laufmittelgemische werden in Volumenteilen (v/v) angegeben. Die Ausbeute bezieht sich auf chromatographisch gereinigte und spektroskopisch reine Substanzen, soweit nicht anders vermerkt.

Medium Performance Liquid Chromatography (MPLC), Reversed-Phase, Präparativ

Geräte: ▪ Teledyne Isco, Inc. CombiFlash Companion

▪ *Armen Instrument* Liquid Chromatography Flash Anlage

Säule: Kronlab Labormaßstab, Glassäule ECOPLUS, TAC25/500LS0-SR-2 und TAC25/250LS0-SR-2

Material: ▪ YMC GEL ODS-A 12 nm, S-50 µm AA12S50

▪ YMC GEL ODS-A 12 nm, S-15 µm AA12S16

▪ YMC GEL Octyl 12 nm, S-50 µm, OC12S50

Die Umkehrphasenchromatographie wurde mit selbstgepackten Kronlab Glassäulen (Durchmesser: 25 mm; Länge 250–500 mm, mit 120 g, 55 g, 50 g, 40 g Material) durchgeführt. Alle Lösemittel wurden vor Gebrauch destilliert. Laufmittelgemische werden in Volumenteilen (v/v) angegeben. Die Ausbeute bezieht sich auf chromatographisch gereinigte und spektroskopisch reine Substanzen, soweit nicht anders vermerkt.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Normal-Phase, Analytisch

Geräte: Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pumpe, Erma Degasser ERC-3512, Knauer UV Detektor 2600, Erma RI-Detektor ERC-7512

Software: SCPA Chromstar 7.0

Säule: Macherey Nagel, EC250/4 NUCLEOSIL 100-7; 250 mm Länge, 4 mm Durchmesser, 7 µm Partikelgröße, 10 nm Porengröße

Bei den für die Chromatographie verwendeten Lösemitteln handelt es sich um kommerziell erhältliche Lösemittel mit “HPLC - Gradient Grade” Qualität. Laufmittelgemische werden in Volumenteilen (v/v) angegeben.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Reversed-Phase, Analytisch

Geräte: Dionex HPLC System: P680 Pumpe, ASI-100 automatischer Probeninjektor, UVD-340U UV Detector, UltiMate 3000 Column Compartment

Software: Dionex Chromeleon 6.80

Säulen:

- AA12S05-1503; YMC-Pack ODS-A, 150 mm, 3.0 mm, 5 µm, 12 nm
- AA12S05-1510WT; YMC-Pack ODS-A, 150 mm, 10 mm, 5 µm, 12 nm
- OC12S05-2546WT; YMC-Pack C8, 250 mm, 4.6 mm, 5 µm, 12 nm
- OC20S03-1504QT; YMC-Pack Octyl, 150 mm, 4.0 mm, 3 µm, 20 nm

Bei den für die Chromatographie verwendeten Lösemitteln handelt es sich um kommerziell erhältliche Lösemittel mit “HPLC - Gradient Grade” Qualität. Laufmittelgemische werden in Volumenteilen (v/v) angegeben.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Reversed-Phase, Präparativ

Geräte: Merck SepTech ST 140 System, Shimadzu SPD-10A UV/Vis-Detektor, Knauer dynamische Mischkammer

Software: SCPA PrepCon 5

Säule: AA12S05-1530WT; YMC-Pack ODS-A, 150 mm, 30 mm, 5 µm, 12 nm

Die Trennung von schwer zu trennenden Produkten im Milligrammmaßstab wurde nach erfolgter Vorreinigung an der MPLC mittels präparativer HPLC durchgeführt. Die benötigten Bedingungen wurden zuvor mittels analytischer HPLC ermittelt und die Übertragbarkeit durch HPLC Säulen von einem Hersteller, gefüllt mit identischem Material, gewährleistet

Bei den für die Chromatographie verwendeten Lösemitteln handelt es sich um kommerziell erhältliche Lösemittel mit “HPLC - Gradient Grade” Qualität. Laufmittelgemische werden in Volumenteilen (v/v) angegeben.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Geräte:

- Bruker DMX 300 (¹H: 300 MHz; ¹³C: 100 MHz)
- Bruker Avance 400 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz)
- Bruker DRX 500 (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz)

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, mit DMSO_{d6} oder CDCl_3 als Lösemittel. Die Angaben der chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten angegeben. Kopplungen werden in Hertz angegeben. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösemittels bei ^1H -NMR-Spektren [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$, $\delta(\text{DMSO}_{d6}) = 2.50$], bzw. ihre ^{13}C -Resonanzsignale bei ^{13}C -NMR-Spektren [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$, $\delta(\text{DMSO}_{d6}) = 39.52$].

Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = singulett, br.s = broad singulett, d = dublett, t = triplett, q = quartett, br. = broad signal und m = multipllett. Die Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, wobei die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale, soweit vorhanden, mittels Literatur erfolgte.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Gerät: Hochauflösendes ESI: Bruker BioTOF III, Bruker Daltonik MicroTOF focus

Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Gerät: Agilent 5973 N Mass Selective Detector, Agilent 6890 N Network GC System

FT-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Geräte:

- Perkin Elmer FT-IR 1600
- Jasco FT-IR 430 Spektrophotometer
- Jasco FT-IR 410 Spektrophotometer

Die Substanzen wurden als KBr-Pressling oder als reine Substanz mit einer Pike Miracle oder Jasco ATR-500M Einheit vermessen. Die Lage der Banden wurde in Wellenzahlen [cm^{-1}] angegeben. Die Bandenintensitäten wurden mit vs = very strong, s = strong, m = medium, w = weak und gegebenenfalls mit br = broad bezeichnet.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Gerät: MicroCal VP-ITC MicroCalorimeter

Software: Implementiertes Plug-In in ORIGIN 7 (Origin Lab)

Die Experimente wurden mit hochreinem entgastem Wasser bzw. entgastem Puffer durchgeführt. Die Referenzzelle des Mikrokalorimeters wurde mit denselben entgasten Lösemittel befüllt, welches für die jeweilige Messung verwendet wurde.

Molecular Modelling (MM)¹⁷⁷

Software: Schrödinger Maestro, MacroModel Vers. 9.6

Die Berechnungen der Strukturen mittels MacroModel wurden basierend auf dem Kraftfeld OPLS2005 und Wasser als Lösemittel durchgeführt.

Schüttelapparatur für die Festphasenpeptidsynthese

Geräte: ▪ yellowline OS 5 basic
 ▪ Rotamax 120 von Heidolph

Magnetrührer mit Heizplatte

Geräte: ▪ MR 3001K von Heidolph
 ▪ RCT basic von IKA

Zentrifugen

Geräte: ▪ Rotofix 32 von Hettich
 ▪ Biofuge pico von Heraeus

Größere Mengen feiner Niederschläge wurden in Kunststoffgefäßen im Rotofix zentrifugiert, während kleine Mengen wie bei der Festphasenpeptidsynthese in Eppendorfcaps in der Biofuge zentrifugiert und gewaschen wurden.

UV/Vis-Spektroskopie

Geräte: Jasco, V 660 Spektrometer 6-fach Küvettenhalter, Temperiereinheit PAC-743, Haake Thermostat WKL-26 oder Varian, Carey 300 Bio UV/Vis-Spektrometer mit 12-fach Küvettenhalter Varian Temperiereinheit

Software: ▪ SPECFIT Version 3.0.32 (*Spectrum Software Associates*)
 ▪ Origin 7 von Origin Lab

Alle Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mm) der Firma Hellma durchgeführt. Die Baseline-Messung erfolgte bei leerem Gerät, die Referenzküvette und die Messküvette wurde mit demselben Lösemittel befüllt. Die Angabe der Wellenlängen erfolgte in nm.

Fluoreszenzspektroskopie

Gerät: Varian Cary Eclipse Fluorimeter

Software: Cary Eclipse

Alle Messungen wurden bei 25 °C in Fluoreszenzquarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mm) der Firma Hellma durchgeführt.

Mikrowelle

Gerät: CEM Discover single mode Mikrowelle

Die Mikrowellen unterstützte Festphasenpeptidsynthese wurde in Kunststoffreaktionsbehälter von CEM durchgeführt, während Reaktionen in Lösung in Standard-Rundkolben (maximal 100 ml Rundkolben) umgesetzt wurden.

6.2 Allgemeine Reaktionsvorschriften für die Festphasen-peptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese wurde unter Argonatmosphäre entweder in der Mikrowelle in Kunststoffreaktionsgefäßen oder in Schlenkglasgefäßen, ausgestattet mit einer Fritte und einem Deckel, durchgeführt. Unter Mikrowellenbedingungen erfolgte die Durchmischung der Reaktionslösung durch Einleiten von Argon während unter Standardbedingungen in den Schlenkglasgefäßen die Durchmischung mit Hilfe einer Schüttelapparatur erfolgte. In beiden Fällen wurde das Lösemittel durch Filtration entfernt.

Anbringung einer Aminosäure an Rink-Amid Harz

Vor der Anbringung der ersten Aminosäure am Rink-Amid Harz musste die Fmoc-Schutzgruppe am Harz abgespalten werden. Dazu ließ man zunächst das Harz für 1 h in 10 ml DMF quellen. Anschließend wurde die Schutzgruppe gemäß Standardprotokoll (siehe Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe) abgespalten. Das Harz wurde danach in 10 ml einer 3 %igen NMM-Lösung in DMF suspendiert, dazu wurden die Fmoc-geschützte Aminosäure (2.5 Äq.) und HCTU (2.5 Äq.) gegeben und das Reaktionsgefäß für 4-5 h, alternativ auch über Nacht, geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Harz viermal mit je 10 ml DMF gewaschen bevor erneut die Schutzgruppe abgespalten wurde.

Anbringung einer Aminosäure an NovaPEG Rink-Amid Harz

Zur Anbringung einer Aminosäure an das NovaPEG Rink-Amid Harz mit Hilfe der Mikrowellentechnik wurde zunächst das Harz mit einem geeigneten Lösemittel in den Kunststoffreaktionsgefäßen für die Mikrowelle gequollen. Hierzu wurde das Harz für 1.5 h in maximal 7 ml einer 1/1 Mischung von Dichlormethan und DMF unter Durchleiten von Argon durchmischt und gequollen. Anschließend wurde eine 0.18 molare Lösung der Fmoc-geschützten Aminosäure, DIC und Cl-HOBt in DMF mit 20 % NMP für 20 min bei 20 W auf 96°C erhitzt. Vor der Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml DMF gewaschen.

Anbringung einer Aminosäure an TentaGel-NH₂-Harz

Zunächst wurde das Harz für 1 h in 10 ml DMF gequollen. Anschließend wurde das Harz in 10 ml einer 3 %igen NMM-Lösung in DMF suspendiert. Dazu wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure (2.5 Äq.) und HCTU (2.5 Äq.) gegeben und das Reaktionsgefäß für 4-5 h

alternativ auch über Nacht, geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz viermal mit DMF (10 ml) gewaschen, bevor erneut die Schutzgruppe abgespalten wurde.

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten, indem das Harz zweimal mit einer Lösung von je 10 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in DMF für 15 min geschüttelt und das Harz anschließend sechsmal mit je 10 ml DMF gewaschen wurde, um letzte Reste an Piperidin zu entfernen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Hilfe der Mikrowelle erfolgte unter folgenden Bedingungen. Das Harz wurde, abhängig von dessen Menge, zweimal mit mindestens je 2 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in DMF versetzt und für 30 s bzw. 3.5 min bei 20 W und 75 °C unter Durchleitung von Argon erhitzt und anschließend sechsmal mit je 5 ml DMF gewaschen.

Acetylierung der freien Aminofunktion am polymeren Träger

Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und viermaligem Waschen mit DMF wurden Essigsäureanhydrid (3 Äq.) und NMM (10 Äq.) in 10 ml einer Mischung von Dichlormethan und DMF im Verhältnis 7/3 über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz vor dem Abspalten bzw. vor der nächsten Kupplung sechsmal mit DMF gewaschen. Die Acetylierung der freien Aminofunktionen mit Hilfe der Mikrowelle erfolgte mit Essigsäureanhydrid (5 Äq.) und DIPEA (10 Äq.) in mindestens 2 ml einer Dichlormethan/DMF Mischung (7/3) bei 20 W und 50 °C für 20 min.

Abspaltung der Produkte vom polymeren Träger

Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten werden konnte, musste es sorgfältig gewaschen werden, um letzte Reste an DMF zu entfernen, da schon Spuren an DMF die Ausbeuten an Produkt dramatisch senken. Das Harz wurde zunächst dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml), anschließend dreimal mit Methanol (je 10 ml), zweimal mit Diethylether (je 10 ml) und zum Abschluss noch dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz entsprechend folgender Protokolle abgespalten.

1. Rink-Amid Harz: Das getrocknete, vollständig von DMF befreite Harz wurde in einer Mischung aus TFA, das 5 % trockenes Dichlormethan (10 ml) enthält, für 2-3 h geschüttelt, wobei das Harz eine tiefrote Farbe annahm. Das Lösemittel wurde filtriert und das Harz noch zweimal mit frischer Abspalllösung (5 ml) gewaschen. Die braune bis rote Reaktionslösung, wurde im Ölpumpenvakuum auf 2-3 ml eingengt. Der Rückstand wurde mit Diethylether

(50 ml) versetzt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Wasser versetzt und anschließend lyophilisiert.

2. NovaPEG Rink-Amid Harz: Das gründlich gewaschene Harz wurde nach der Synthese in den Mikrowellenkunststoffgefäßen in die Glasgefäße für die Schüttler überführt und nach Entfernen des Lösemittels sorgfältig im Membranpumpenvakuum getrocknet. Die Abspaltung erfolgte anschließend in einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser. Das Harz wurde zweimal mit je 10 ml der Abspalllösung für 1.5 h versetzt. Die vereinigten Filtrate wurden bis auf 2-3 ml im Ölpumpenvakuum eingeeengt, der Rückstand mit frisch destilliertem Diethylether (50 ml) versetzt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert, mit Wasser versetzt und anschließend lyophilisiert.

Detektion von freien Aminosäurefunktionen an polymeren Trägern (Kaiser-Test)¹³³

Es wurden Lösungen aus Ninhydrin (1.00 g) in Ethanol (10 ml) und Phenol (40.0 g) in Ethanol (10 ml) angesetzt. Einige Harzpartikel des zu analysierenden Polymers wurden mit je 500 µl der beiden Lösungen versetzt und für maximal 5 min auf 120 °C erhitzt. Polymerpartikel mit freien Aminofunktionen färbten sich tiefblau bis braun, während Harz ohne freie Aminofunktionen farblos blieb.

Quantifizierung der Anknüpfung von Fmoc-geschützten Aminosäuren am festen Träger

Um die an TentaGel-Harzen bzw. PEG-Harzen gebundenen Fmoc-Aminosäuren quantifizieren zu können, wurde mit Hilfe des UV-Spektrometers eine Kalibrierkurve in DMF erstellt, die die Konzentration des Fmoc-Piperidin-Adduktes mit der Extinktion korreliert. Es wurde Fmoc-L-Leucin (35.3 mg, 0.1 mmol) 10 min mit 20 % Piperidin in DMF (10 ml) geschüttelt und danach auf 100 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung des Fmoc-Piperidin-Adduktes wurde mit DMF weiter verdünnt. Im Konzentrationsbereich von 0.05 mmol·L⁻¹ bis 0.25 mmol·L⁻¹ ergab sich bei 300 nm, dem Maximum der Absorption, ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion. Die Kalibrierung wurde mehrfach durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient wurde zu $\epsilon = 6344 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt.^[178] Durch die Extinktion der Abspalllösung konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten die jeweilige Beladung des Harzes ermittelt werden.

Bestimmung der realen Beladung des verwendeten NovaPEG Rink-Amid Harzes

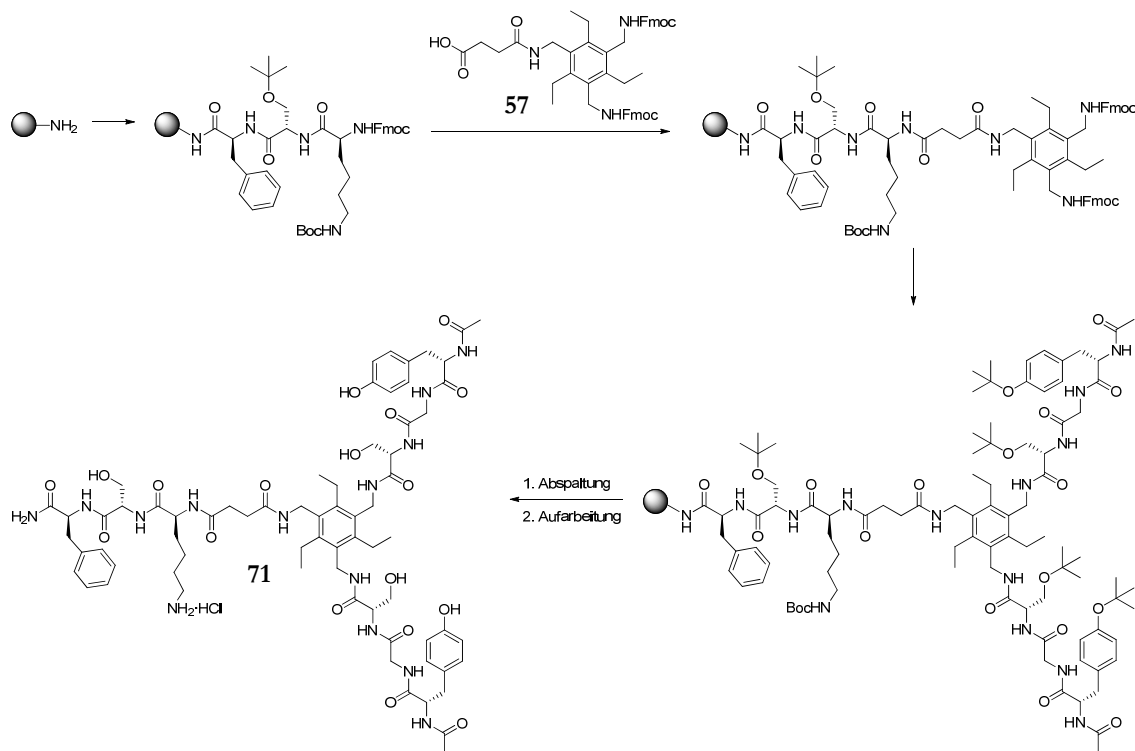
Es wurden zweimal je 100 mg NovaPEG Rink-Amid Harz genau eingewogen und in einen Scheidetrichter mit Fritte und Absaughahn überführt. Das Harz wurde für 3 h mit DMF (10 ml) geschüttelt, damit eine ausreichende Quellung des Harzes gewährleistet wurde.

Anschließend wurde das DMF abgesaugt und das Harz mit einer 3 %igen NMM-Lösung (0.31 ml) in DMF (10 ml) versetzt. Dazu wurde Fmoc-*L*-Valin (5.00 Äq), sowie PyBOP (5.00 Äq) (jeweils bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes) unter Argon zu der Reaktionsmischung gegeben und das Reaktionsgefäß über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und die Kupplung ein zweites Mal wiederholt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Harz viermal mit DMF (je 10 ml) gewaschen, wobei das Harz mit jeder Waschlösung 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde abgespalten, indem das Harz zweimal mit einer 20 %igen Lösung von Piperidin in DMF (je 10 ml) für 20 min geschüttelt wurde. Das Harz wurde noch dreimal mit DMF (je 10 ml) gewaschen, wobei jeder Vorgang durch zehnminütiges Schütteln in der Waschlösung begleitet wurde. Die aufgefangenen Abspalt- und Waschlösungen wurden auf ein Gesamtvolumen von je 100 ml aufgefüllt und die UV-Extinktionen der resultierenden Lösungen bestimmt. Anhand einer zuvor aufgenommenen Eichgeraden konnte die Beladung des Harzes quantifiziert werden.

Für die erhaltene Charge wurde die Beladung auf $0.340 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ (Iris Biotech Zertifikat: $0.450 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) bestimmt.

6.3 Synthesen an der festen Phase

6.3.1 Synthese des Rezeptors 71



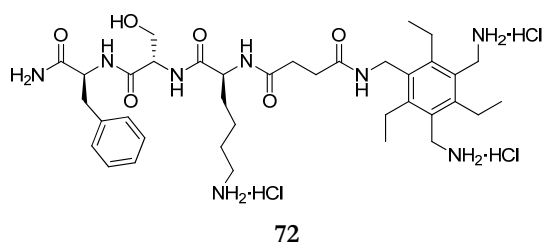
NovaPEG Rink-Amid Harz (Beladung: 0.45 mmol·g⁻¹, 200 mg, 0.09 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 6 ml Dimethylformamid/Dichlormethan (1/1) für 1.5 h gequollen. Die Kupplung aller Aminosäuren bzw. Bausteine erfolgte in einer 0.18 molaren Lösung unter Mikrowellenbedingungen. Die erste Kupplung von Fmoc-Phe-OH wurde zweimal durchgeführt mit Fmoc-Phe-OH (104 mg, 0.27 mmol, 3.00 Äq.), DIC (42.0 µl, 0.27 mmol, 3.00 Äq) und Cl-HOBt (46.0 mg, 0.27 mmol, 3.00 Äq.) in 1.5 ml Dimethylformamid mit 20 % NMP für 20 min bei 20 W und 96 °C. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen. Nach erfolgtem negativem Kaisertest wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie folgt abgespalten. Das Harz wurde zweimal mit je 2 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in Dimethylformamid versetzt und einmal für 30 s bei 20 W und 75 °C erhitzt und ein zweites Mal mit frischer Abspaltlösung für 3.5 min unter denselben Bedingungen erhitzt. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen und nach erfolgtem positivem Kaisertest mit der nächsten Kupplung unter den Bedingungen wie schon beschrieben fortgefahren. Die folgenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (104 mg, 0.27 mmol, 3.00 Äq), Fmoc-Lys(Boc)-OH (126 mg, 0.27 mmol, 3.00 Äq.) und Baustein **57** (214 mg, 0.27 mmol, 3.00 Äq.) wurden jeweils nur einmal durchgeführt während die

anschließenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (208 mg, 0.54 mmol, 6.00 Äq.), Fmoc-Gly-OH (160 mg, 0.54 mmol, 6.00 Äq.) und Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (496 mg, 0.54 mmol, 12.0 Äq.) zweimal durchgeführt wurden. Die Lösemittelmenge wurde im Fall der Kupplung von Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH auf 3 ml erhöht. Bei jeder Kupplung betrug die Konzentration der Reaktionslösung mindestens 0.18 mmol bezogen auf die entsprechende Aminosäure und enthielt DIC (42.0 µl, 0.27 mmol, 3.00 Äq. bzw. 84.0 µl, 0.54 mmol, 6.00 Äq.) und Cl-HOBt (46.0 µl, 0.27 mmol, 3.00 Äq. bzw. 92.0 µl, 0.54 mmol, 6.00 Äq.) Jeder Kupplungsschritt wurde mittels des Kaisertests überprüft. Nach der letzten erfolgreichen Kupplung folgte ein Acetylierungsschritt mit Essigsäureanhydrid (43.0 µl, 0.45 mmol, 5.00 Äq.) und DIPEA (154 µl, 0.90 mmol, 10.0 Äq.) in Dichlormethan/Dimethylformamid (7/3). Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten wurde, wurde das Harz dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml), anschließend dreimal mit Methanol (je 10 ml), zweimal mit Diethylether (je 10 ml) und zum Abschluss noch dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz zweimal mit je 20 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser für je 1.5 h abgespalten. Anschließend wurde das Harz nochmals mit 10 ml der Abspaltlösung gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Ölpumpenvakuum auf ca. 2 ml eingengt, mit 50 ml frisch destilliertem Diethylether versetzt, der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert, gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 50 g, 12 nm, 15 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 30 ml·min⁻¹, isokratisch Acetonitril/Wasser 22/78 mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure; präparative HPLC, RP18, 12 nm, 5 µm, 150 x 30 mm, 43 ml·min⁻¹, isokratisch Acetonitril/Wasser 22/78 mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure) gereinigt. Das Produkt **71** konnte unter Berücksichtigung der realen Beladung des Harzes (0.34 mmol·g⁻¹) in einer Ausbeute von 2 % (2.00 mg, 1.38 µmol) als Chloridsalz erhalten werden.

C₆₉H₉₇ClN₁₄O₁₈: 1446.045 g·mol⁻¹; **Smp** = 165 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.06 (t, ³J = 7.23 Hz, 9H, CH₃), 1.26-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.47-1.55 (m, 3H, CH₂), 1.62-1.67 (m, 1H, CH₂), 1.76 (s, 6H, CH₃), 2.34-2.38 (m, 4H, CH₂), 2.59-2.65 (m, 8H, CH₂), 2.71-2.74 (m, 2H, CH₂), 2.82 (dd, ²J = 14.0 Hz, ⁴J = 9.64 Hz, 1H, CH), 2.87-2.89 (m, 2H, CH₂), 3.06-3.08 (m, 1H, CH), 3.48-3.61 (m, 6H, CH₂), 3.68 (dd, ²J = 16.9 Hz, ⁴J = 5.78 Hz, 2H, CH₂), 3.75 (dd, ²J = 16.9 Hz, ⁴J = 6.26 Hz, 2H, CH₂), 4.18-4.38 (m, 13H, CH, CH₂), 4.92 (t, ³J = 5.69 Hz, 2H, OH), 5.06 (t, ³J = 5.69 Hz, 1H, OH), 6.64 (d, ³J = 8.11 Hz, 4H, CH), 7.03 (d, ³J = 8.59 Hz, 4H, CH), 7.17-7.25 (m, 7H, CH, NH₂), 7.31 (s, 1H, NH), 7.77 (br.s, 2H, NH), 7.81-7.88 (m, 6H, NH₃⁺, NH), 8.03 (d, ³J = 7.15 Hz, 1H, NH), 8.13 (d, ³J = 7.63 Hz, 2H, NH), 8.15 (d, ³J = 7.15 Hz, 1H, NH), 8.26 (t, ³J = 5.72 Hz, 2H, NH), 9.18 (s, 2H, OH); **¹³C-NMR** (176.07 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 16.1 (CH₃), 22.2 (CH₂), 22.4 (CH₃), 26.5, 29.0, 30.4, 30.7, 31.0,

36.6 (CH₂), 37.1, 37.3 (CH), 38.5, 42.0 (CH₂), 52.6 (CH), 54.0 (CH₂), 54.7, 54.8 (CH), 55.6 (CH₂), 61.5, 61.9 (CH₂), 114.9, 126.2, 128.0, 128.1 (CH), 129.1, 130.0, 137.9, 143.4 (C_q), 168.5, 169.5, 169.6, 169.7, 171.2, 171.9, 172.0, 172.1, 172.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3248 w, 3063 w, 1633 s, 1514 s, 1227 m, 1045 m, 701 m, 659 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1409.710—gemessen 1409.720 für C₆₉H₉₇N₁₄O₁₈⁺.

6.3.2 Synthese des Rezeptors 72

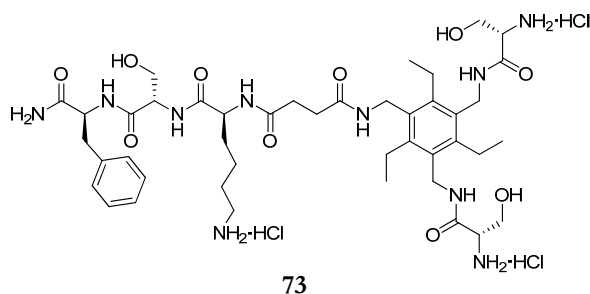


NovaPEG Rink-Amid Harz (Beladung: 0.45 m·molg⁻¹, 200 mg, 0.09 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 6 ml Dimethylformamid/Dichlormethan (1/1) für 1.5 h gequollen. Die Kupplung aller Aminosäuren bzw. Bausteine erfolgte in einer 0.18 molaren Lösung unter Mikrowellenbedingungen. Die erste Kupplung von Fmoc-Phe-OH wurde zweimal durchgeführt mit je Fmoc-Phe-OH (139 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.), DIC (56.0 µl, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) und Cl-HOBt (61.0 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) in 2 ml Dimethylformamid mit 20 % NMP für 20 min bei 20 W und 96 °C. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml für 2-5 min gewaschen. Nach erfolgtem negativem Kaisertest wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie folgt abgespalten. Das Harz wurde zweimal mit je 2 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in Dimethylformamid versetzt und einmal für 30 s bei 20 W und 75 °C erhitzt und ein zweites Mal mit frischer Abspaltlösung für 3.5 min unter denselben Bedingungen erhitzt. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen und nach erfolgtem positivem Kaisertest mit der nächsten Kupplung unter den Bedingungen wie schon beschrieben fortgefahren. Die folgenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (138 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.), Fmoc-Lys(Boc)-OH (169 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) wurden je zweimal durchgeführt während Baustein **57** (286 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) nur einmal gekuppelt wurde. Bei jeder Kupplung betrug die Konzentration der Reaktionslösung 0.18 mmol bezogen auf die entsprechende Aminosäure und enthielt DIC (56.0 µl, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) und Cl-HOBt (61.0 µl, 0.36 mmol, 4.00 Äq.). Jeder Kupplungsschritt wurde mittels des Kaisertests überprüft. Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten wurde, wurde es sorgfältig gewaschen. Das Harz wurde zunächst dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml), anschließend dreimal mit

Methanol (je 10 ml), zweimal mit Diethylether (je 10 ml) und zum Abschluss noch dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz zweimal mit je 20 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser für je 1.5 h abgespalten. Anschließend wurde das Harz nochmals mit 10 ml der Abspalllösung gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden im Ölpumpenvakuum auf ca. 2 ml eingeeengt, mit 50 ml frisch destilliertem Diethylether versetzt, der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert, gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 40 g, 12 nm, 50 μ m, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, isokratisch Acetonitril/Wasser 25/75 mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure; präparative HPLC, RP18, 12 nm, 5 μ m, 150 x 30 mm, 43 ml·min⁻¹, isokratisch Acetonitril/Wasser 13/87 mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure) gereinigt. Das Produkt **72** konnte unter Berücksichtigung der realen Beladung des Harzes (0.34 mmol g⁻¹) in einer Ausbeute von 39 % (22.0 mg, 26.9 μ mol) als Chloridsalz erhalten werden.

C₃₇H₆₁Cl₃N₈O₆: 820.289 g·mol⁻¹; **Smp** = 186 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.09 (br.s, 9H, CH₃), 1.26-1.35 (m, 2H, CH₂), 1.45-1.55 (m, 3H, CH₂), 1.60-1.68 (m, 1H, CH₂), 2.36-2.38 (m, 4H, CH₂), 2.74 (br.s, 8H, CH₂), 2.82 (dd, ²J = 14.1 Hz, ⁴J = 9.15 Hz, 1H, CH₂), 3.07 (dd, ²J = 13.7 Hz, ⁴J = 4.23 Hz, 1H, CH₂), 3.47-3.51 (m, 1H, CH₂), 3.56-3.61 (m, 1H, CH₂), 4.02 (br.s, 4H, CH₂), 4.18-4.23 (m, 2H, CH), 4.31 (br.s, 2H, CH₂), 4.35-4.39 (m, 1H, CH), 5.07 (t, ³J = 5.39 Hz, 1H, OH), 7.19-7.33 (m, 7H, CH, NH₂), 7.78 (br.s, 3H, NH₃⁺), 7.89 (d, ³J = 8.09 Hz, 1H, NH), 7.94 (br.s, 1H, NH), 8.00 (d, ³J = 8.09 Hz, 1H, NH), 8.14 (d, ³J = 7.19 Hz, 1H, NH), 8.28 (br.s, 6H, NH₃⁺); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.9 (CH₃), 22.2, 22.8, 26.6, 30.4, 30.6, 31.1, 31.3, 36.1, 38.5 (CH₂), 52.6, 54.0, 55.5 (CH), 61.6, 65.2 (CH₂), 126.2, 128.0, 128.7, 129.1 (CH), 137.9, 144.1, 145.2 (C_q), 169.7, 171.2, 171.9, 172.0, 172.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3289 w, 2039 w, 1732 m, 1652 m, 1519 m, 1174 m, 956 m, 781 m, 623 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 711.455—gemessen 711.459 für C₃₇H₅₉N₈O₆⁺.

6.3.3 Synthese des Rezeptors 73



NovaPEG Rink-Amid Harz (Beladung: $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 200 mg, 0.09 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 6 ml Dimethylformamid/Dichlormethan (1/1) für 1.5 h gequollen. Die Kupplung aller Aminosäuren bzw. Bausteine erfolgte in einer 0.18 molaren Lösung unter Mikrowellenbedingungen. Die erste Kupplung von Fmoc-Phe-OH wurde zweimal durchgeführt mit je Fmoc-Phe-OH (139 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.), DIC (56.0 μl , 0.36 mmol, 4.00 Äq.) und Cl-HOBt (61.0 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) in 2 ml Dimethylformamid mit 20 % NMP für 20 min bei 20 W und 96 °C. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen. Nach erfolgtem negativem Kaisertest wurde die Fmoc-Schutzgruppe wie folgt abgespalten. Das Harz wurde zweimal mit je 2 ml einer 20 %igen Piperidin-Lösung in Dimethylformamid versetzt und einmal für 30 s bei 20 W und 75 °C erhitzt und ein zweites Mal mit frischer Abspaltlösung für 3.5 min unter denselben Bedingungen erhitzt. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit je 5 ml Dimethylformamid für 2-5 min gewaschen und nach erfolgtem positivem Kaisertest mit der nächsten Kupplung unter den Bedingungen wie schon beschrieben fortgefahren. Die folgenden Kupplungen mit Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (138 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.), Fmoc-Lys(Boc)-OH (169 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) wurden je zweimal durchgeführt, Baustein **57** (286 mg, 0.36 mmol, 4.00 Äq.) wurde nur einmal gekuppelt und Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (276 mg, 0.72 mmol, 8.00 Äq.) wurde wieder zweimal gekuppelt. Bei jeder Kupplung betrug die Konzentration der Reaktionslösung 0.18 mmol bezogen auf die entsprechende Aminosäure und enthielt DIC (56.0 μl , 0.36 mmol, 4.00 Äq. bzw. 112 μl , 0.72 mmol, 8.00 Äq.) und Cl-HOBt (61.0 μl , 0.36 mmol, 4.00 Äq. bzw. 122 mg, 0.72 mmol, 8.00 Äq.) Jeder Kupplungsschritt wurde mittels des Kaisertests überprüft. Bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten wurde, wurde es sorgfältig dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml), anschließend dreimal mit Methanol (je 10 ml), zweimal mit Diethylether (je 10 ml) und zum Abschluss noch dreimal mit Dichlormethan (je 10 ml) gewaschen. Nach gründlichem Trocknen im Membranpumpenvakuum wurde das Produkt vom Harz zweimal mit je 20 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser für je 1.5 h abgespalten. Anschließend wurde das Harz nochmals mit 10 ml der Abspaltlösung gewaschen. Die

vereinigten Filtrate wurden im Ölpumpenvakuum auf ca. 2 ml eingengt, mit 50 ml frisch destilliertem Diethylether versetzt, der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert, mit Diethylether gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (präparative HPLC, RP18, 12 nm, 5 μ m, 150 x 30 mm, 43 ml·min⁻¹, isokratisch Acetonitril/Wasser 14/86 mit Zusatz von 0.05 % Trifluoressigsäure) gereinigt. Das Produkt **73** konnte unter Berücksichtigung der realen Beladung des Harzes (0.34 mmol·g⁻¹) in einer Ausbeute von 24 % (16.0 mg, 16.1 μ mol) als Chloridsalz erhalten werden.

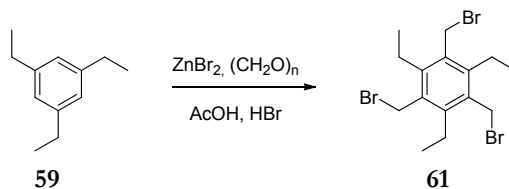
C₄₈H₇₁Cl₃N₁₀O₁₀: 994.444 g·mol⁻¹; **Smp** = 172 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.07-1.10 (m, 9H, CH₃), 1.27-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.49-1.57 (m, 3H, CH₂), 1.62-1.68 (m, 1H, CH₂), 2.33-2.39 (m, 4H, CH₂), 2.64-2.68 (m, 6H, CH₂), 2.73-2.74 (m, 2H, CH₂), 2.82 (dd, ²J = 13.7 Hz, ⁴J = 9.14 Hz, 1H, CH₂), 2.92 (dd, ²J = 13.9 Hz, ⁴J = 7.94 Hz, 1H, CH₂), 3.00-3.08 (m, 1H, CH), 3.56-3.61 (m, 1H, CH), 3.66-3.74 (m, 4H, CH₂), 3.83 (br.s, 2H, CH₂), 4.17-4.43 (m, 9H, CH, CH₂), 5.09 (t, ³J = 5.07 Hz, 1H, OH), 5.48 (t, ³J = 3.89 Hz, 2H, OH), 7.13-7.33 (m, 9H, CH, NH, NH₂), 7.89-7.95 (m, 5H, NH₃⁺, NH), 8.00-8.06 (m, 1H, NH), 8.12-8.20 (m, 7H, NH₃⁺, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.1 (CH₃), 22.2, 22.5, 26.5, 30.5, 30.7, 37.1, 37.5, 38.5 (CH₂), 52.7, 54.0, 54.1, 55.6 (CH), 60.4, 61.5 (CH₂), 126.2, 126.4, 128.0, 128.1, 129.1, 129.2 (CH), 131.1, 132.4, 137.2, 137.9, 143.3, 143.6, 166.6 (C_q), 169.7, 171.2, 171.7, 171.8, 172.0, 172.8 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3229 m, 2970 m, 1636 s, 1538 s, 1455 m, 1233 m, 1177 m, 1147 m, 1045 m, 702 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 885.519—gemessen 885.508 für C₄₈H₆₉N₁₀O₁₀⁺.

6.4 Synthesen in Lösung

6.4.1 Synthese von Baustein 57 für die Festphasensynthese

1. Syntheseweg zu Verbindung 57

Synthese der Verbindung 61

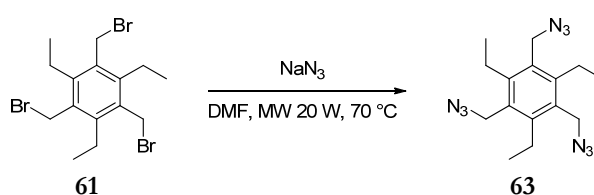


Zu einer Lösung von Triethylbenzol **59** (10.0 ml, 53.1 mmol, 1.00 Äq.) und Paraformaldehyd (16.7 g, 556 mmol, 10.5 Äq.) in AcOH/HBr 30 wt % (100 ml) wurde Zinkbromid (19.7 g, 87.5 mmol, 1.60 Äq.) portionsweise zugegeben und anschließend für 17 h auf 90 °C erhitzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über

Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. Das Produkt **61** konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 89 % (21.0 g, 47.6 mmol) erhalten werden.

C₁₅H₂₁Br₃: 441.039 g·mol⁻¹; **Smp** = 173-175 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.35 (t, ³J = 7.6 Hz, 9H, CH₃), 2.94 (q, ³J = 7.6 Hz, 6H, CH₂), 4.58 (s, 6H, CH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 15.7 (CH₃), 22.9, 28.7 (CH₂), 132.8, 145.2 (C_q); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3437 w, 3007 w, 2965 m, 2905 m, 1568 m, 1451 m, 1200 s, 760 m, 702 m; **GC-MS** m/z = berechnet 438—gemessen 438 für C₁₅H₂₁Br₃.

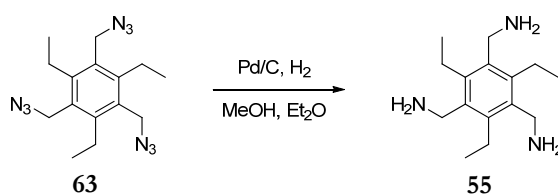
Synthese der Verbindung 63



In 20 ml trockenem DMF wurde Tribromid **61** (5.00 g, 11.3 mmol 1.00 Äq.) suspendiert und anschließend Natriumazid (2.21 g, 34.0 mmol, 3.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h auf 70 °C ohne Rückflusskühler erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit 80 ml eisgekühltem Wasser unter Rühren versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und über Orangegel getrocknet. Produkt **63** wurde als hellbeiger Feststoff in einer Ausbeute von 90 % (3.34 g, 10.2 mmol) erhalten.

C₁₅H₂₁N₉: 327.388 g·mol⁻¹; **Smp** = 66-68 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 1.24 (t, ³J = 7.73 Hz, 9H, CH₃), 2.85 (q, ³J = 7.73 Hz, 6H, CH₂), 4.49 (s, 6H, CH₂); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃) δ = 15.9 (CH₃), 23.3, 48.1 (CH₂), 130.1, 145.1 (C_q); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 2970 m, 2908 w, 2083 s, 1495 w, 1450 m, 1331 m, 1262 s, 1225 s, 1040 m, 941 m, 857 m, 773 m, 649m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 350.181—gemessen 350.184 für C₁₅H₂₁N₉ + Na⁺.

Synthese der Verbindung 55

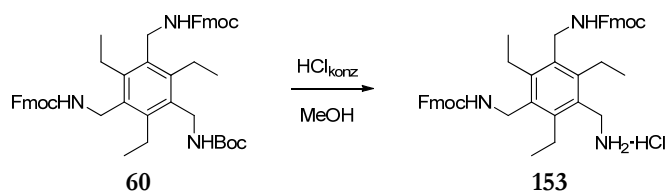


In einer Mischung aus 178 ml Methanol und 444 ml Diethylether wurde Triazid **63** (4.00 g, 12.2 mmol, 1.00 Äq.) gelöst, unter Argonatmosphäre Pd/C (400 mg, 10 %) zugegeben und

C₁₅H₂₇N₃: 249.395 g·mol⁻¹; **Smp** = 82 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.23 (t, ³J = 7.4 Hz, 9H, CH₃), 2.85 (q, ³J = 7.4 Hz, 6H, CH₂), 4.46 (s, 6H, CH₂), 7.26 (s, 6H, NH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 16.1 (CH₃), 22.7 (CH₂), 36.9 (CH₂), 131.4, 143.9 (C_q); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 2968 m, 1638 m, 1571 m, 1478 m, 1441 m, 1367 m, 836 w, 774 w, 698 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 272.210—gemessen 272.211 für C₁₅H₂₇N₃ + Na⁺.

C₅₀H₅₅N₃O₆: 793.988 g·mol⁻¹; **Smp** = 130 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-_d₆) δ = 1.05-1.12 (m, 9H, CH₃), 1.93 (s, 9H, CH₃), 2.66-2.71 (m, 6H, CH₂), 4.18-4.31 (m, 12H, CH, CH₂), 7.24-7.88 (m, 19H, CH, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-_d₆) δ = 16.5 (CH₃), 22.5 (CH₂), 28.2 (CH₃), 46.8 (CH), 65.5 (CH₂), 77.8 (Cq), 120.0, 125.3, 127.0, 127.6 (CH), 131.8, 132.3, 140.7, 143.1, 143.9 (C_q), 155.2, 155.8, 156.0 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3320 m, 2927 m, 1685 s, 1510 s, 1449 s, 1247 s, 759 m, 740 s; **HR-MS** (pos. ESI): m/z: berechnet 816.398—gemessen 816.398 für C₅₀H₅₅N₃O₆ + Na⁺.

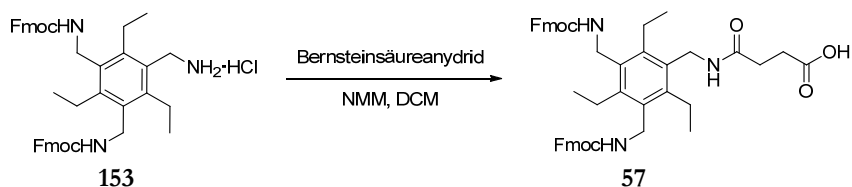
Synthese der Verbindung 153



Zu einer Mischung von Methanol (2 ml) und konzentrierter Salzsäure (2 ml) wurde das Templat **60** (92.0 mg, 0.12 mmol) gegeben und die erhaltene Lösung für 48 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung destillativ vom Lösemittel befreit und das Produkt **153** konnte quantitativ (85.0 mg, 0.12 mmol, 100 %) erhalten werden.

C₄₅H₄₈N₃O₄: 730.333 g·mol⁻¹; **Smp** = 143 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.05-1.12 (m, 9H, CH₃), 2.66-2.71 (m, 6H, CH₂), 3.99 (m, 2H, CH₂), 4.19-4.21 (m, 2H, CH), 4.29-4.32 (m, 8H, CH₂), 7.29-7.88 (m, 18H, CH, NH), 8.15 (br.s, 3H, NH₃⁺); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0 (CH₃), 22.6, 27.9, 28.0, 38.9, 39.4 (CH₂), 46.7 (CH), 65.6 (CH₂), 120.1 (CH), 125.2 (C_q), 127.0, 127.6 (CH), 128.2, 132.6, 140.7, 143.8 (C_q), 155.9 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3327 m, 2966 m, 1685 s, 1523 s, 1449 m, 1326 w, 1246 m, 1120 w, 1047 w, 759 m, 740 s; **HR-MS** (pos. ESI): m/z: berechnet 694.364—gemessen 694.364 für C₄₅H₄₈N₃O₄⁺.

Synthese von Baustein 57



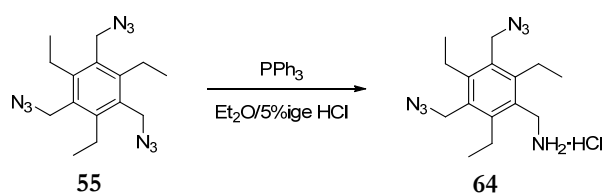
Eine Lösung des Templats **153** (50.0 mg, 0.07 mmol, 1.00 Äq.) und NMM (0.03 ml) in Dichlormethan (2 ml) wurde auf 0 °C abgekühlt und anschließend Bernsteinsäureanhydrid (7.00 mg, 0.07 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, danach mit Salzsäure angesäuert und die zwei Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und abschließend im Vakuum vom Lösemittel befreit. Das Produkt **57** konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 95 % (52.0 mg, 0.07 mmol) erhalten werden.

C₄₉H₅₁N₃O₇: 793.945 g·mol⁻¹; **Smp** = 133-135 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.07-1.09 (m, 9H, CH₃), 2.33 (t, ³J = 6.95 Hz, 2H, CH₂), 2.43 (t, ³J = 6.44 Hz, 2H, CH₂), 2.67-2.76 (m, 6H, CH₂), 4.19 (t, ³J = 6.95 Hz, 2H, CH₂), 4.27-4.31 (m, 10H, CH, CH₂), 7.29-7.88 (m,

19H, CH, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, DMSO-d_6) δ = 16.1 (CH_3), 22.4, 27.9, 28.0, 38.9, 39.3 (CH_2), 46.7 (CH), 65.6, 66.3 (CH_2), 120.0 (CH), 125.3 (C_q), 127.0, 127.6 (CH), 128.2, 132.0, 140.7, 143.1, 143.9 (C_q), 155.9, 170.6, 173.8 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm^{-1}] = 3320 m, 2964 s, 1709 m, 1526 m, 1449 w, 1413 w, 1261 s, 1097 s, 1020 s, 800 s; **HR-MS** (pos. ESI): m/z: berechnet 816.362—816.362 gemessen für $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_7 + \text{Na}^+$.

2. Syntheseweg zu Verbindung 57

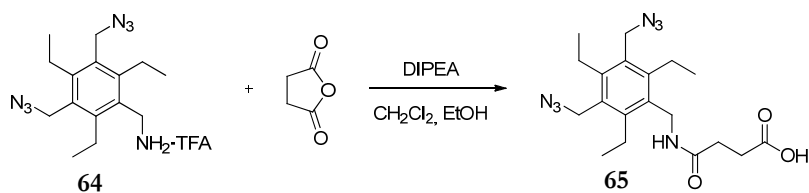
Synthese der Verbindung 64



Zu einer Lösung von Triazid **55** (250 mg, 0.764 mmol, 1.00 Äq.) in 3.75 ml Diethylether/Essigester 9/1 und 12.5 ml 5 %iger Salzsäure wurde eine Lösung von Triphenylphosphin (240 mg, 0.915 mmol, 1.20 Äq.) in 3.75 ml Diethylether/Essigester 9/1 über 5 h zu getropft. Nach Ende der Zugabe wurde die Salzsäurephase abgenommen und mit der gleichen Menge 5 %iger Salzsäure ersetzt und weitere 11 h bei 45 °C refluxiert. Anschließend wurde die organische Phase zweimal mit je 12.5 ml 5 %iger Salzsäure ausgeschüttelt. Die vereinigten Salzsäurephasen wurden destillativ vom Lösemittel befreit, lyophilisiert und der erhaltene Feststoff chromatographisch MPLC, RP18, 120 g, 50 μm , 100 x 2.5 cm, 220 nm, 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, Gradient Methanol 20 % bis 100 % in 45 min mit 0.05 % TFA-Zusatz, Produktpeak in 22.0 min) gereinigt. Produkt **64** wurde als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 48 % (124 mg, 0.367 mmol) erhalten.

$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{ClN}_7$: 337.851 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; **Smp** = 155 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ = 1.11-1.15 (m, 9H, CH_3), 2.76-2.83 (m, 6H, CH_2), 3.98 (q, 3J = 5.22 Hz, 2H, CH_2), 4.58 (s, 4H, CH_2), 8.42 (br.s, 3H, NH_3^+); $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CDCl_3) δ = 15.7, 15.8 (CH_3), 22.5, 22.8, 35.8, 47.6 (CH_2), 129.0, 130.1, 144.9, 145.2 (C_q); **FT-IR** (ATR) [cm^{-1}] = 3653 w, 2976 w, 2107 m, 1660 m, 1523 w, 1375 w, 1197 m, 1180 m, 1140 s, 1039 w, 838 m, 799 m, 724 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 302.209—gemessen 302.213 für $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_7^+$.

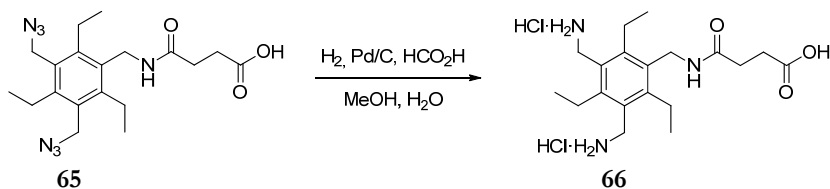
Synthese der Verbindung 65



Edukt **64** (346 mg, 0.832 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 7 ml Dichlormethan und 4.25 ml Ethanol gelöst und anschließend Bernsteinsäureanhydrid (863 mg, 8.62 mmol, 10.0 Äq.) und DIPEA (443 µl, 2.59 mmol, 3.00 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und abschließend das Lösemittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 25 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 60 % bis 100 % in 45 min mit 0.05 % TFA-Zusatz) gereinigt. Produkt **65** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 69 % (238 mg, 0.593 mmol) erhalten.

C₁₉H₂₇N₇O₃; 401.463 g·mol⁻¹; **Smp** = 132-134°C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.11-1.15 (m, 9H, CH₃), 2.33 (t, ³J = 7.24 Hz, 2H, CH₂), 2.43 (t, ³J = 7.24 Hz, 2H, CH₂), 2.70 (q, ³J = 7.48 Hz, 4H, CH₂), 2.79 (q, ³J = 7.48 Hz, 2H, CH₂), 4.28 (d, ³J = 4.48 Hz, 2H, CH₂), 4.57 (s, 4H, CH₂), 8.02 (t, ³J = 4.34 Hz, 1H, NH), 12.04 (s, 1H, COOH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.8, 15.9 (CH₃), 22.4, 22.5, 29.1, 29.7, 37.0, 47.7 (CH₂), 129.6, 132.7, 143.5, 144.4 (C_q), 170.7, 173.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3286 m, 2089 s, 1697 s, 1631 s, 1428 m, 1334 m, 1256 m, 1200 m, 911 m, 732 w; **HR-MS** (neg. ESI) m/z = berechnet 400.209—gemessen 400.211 für C₁₉H₂₆N₇O₃.

Synthese der Verbindung 66

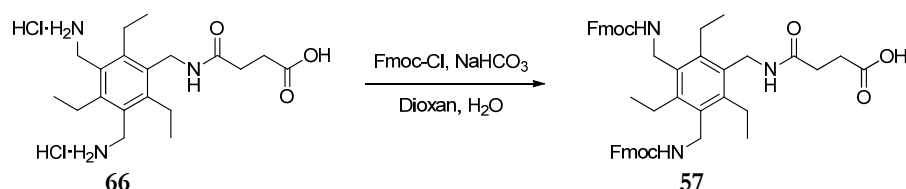


In 3 ml Ethanol wurde Edukt **65** (100 mg, 0.250 mmol, 1.00 Äq.) gelöst, unter Argonatmosphäre Pd/C (44.0 mg Pd/C, 0.050 mmol Pd, 10 %reines Pd pro Azidfunktion) und Ameisensäure (56.0 µl, 2.25 mmol, 9.00 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei 90 °C Badtemperatur für 4 h erhitzt. Nachdem die Reaktion abgekühlt war wurde die Pd/C über einen Membranfilter (Nylon, 0.45 µm) abfiltriert und gründlich

gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde destillativ vom Lösemittel befreit, der erhaltene Feststoff mit verdünnter Salzsäure versetzt und anschließend lyophilisiert. Das Produkt **66** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 58 % (61.0 mg, 0.145 mmol) erhalten.

C₁₉H₃₃Cl₂N₃O₃: 422.390 g·mol⁻¹; **Smp** = 166 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.08-1.11 (m, 9H, CH₃), 2.34 (t, ³J = 7.24 Hz, 2H, CH₂), 2.43 (t, ³J = 6.99 Hz, 2H, CH₂), 2.73-2.80 (m, 6H, CH₂), 4.02 (q, ³J = 5.24 Hz, 4H, CH₂), 4.31 (d, ³J = 4.62 Hz, 2H, CH₂), 7.94 (t, ³J = 4.87 Hz, 1H, NH), 8.39 (t, ³J = 4.74 Hz, 6H, NH₃⁺); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 15.9 (CH₃), 22.8, 23.1, 36.0, 37.0 (CH₂), 128.6, 133.1, 144.1, 145.1 (C_q), 170.7, 173.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3040 w, 2832 w, 1721 m, 1668 m, 1590 m, 1413 m, 1362 w, 1126 s, 833 s, 795 s, 721 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 350.244—gemessen 350.248 für C₁₉H₃₂N₃O₃⁺.

Synthese von Baustein 57

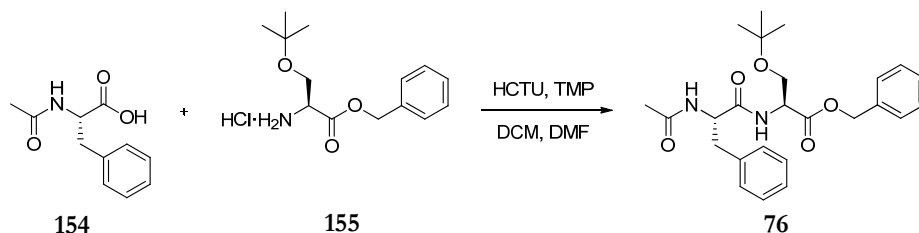


In 2.1 ml einer 6 %igen NaHCO₃-Lösung wurde Edukt **66** (70.0 mg, 0.121 mmol, 1.00 Äq.) gelöst, in 2.8 ml Dioxan wurde Fmoc-Cl (76.0 mg, 0.315 mmol, 2.60 Äq.) gelöst und beide Lösungen zusammengegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 5 %iger Salzsäure auf pH 1 angesäuert und viermal mit 15 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 50 µm, 50 x 2.5 cm, 265 nm, 20 ml·min⁻¹, Gradient Acetonitril 80 % bis 100 % in 45 min mit 0.05 % TFA-Zusatz, Produktpeak nach 22.0 min) gereinigt. Produkt **57** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 43 % (41.0 mg, 0.052 mmol) erhalten.

C₄₉H₅₁N₃O₇: 793.945 g·mol⁻¹; **Smp** = 133-135 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.07-1.09 (m, 9H, CH₃), 2.33 (t, ³J = 6.95 Hz, 2H, CH₂), 2.43 (t, ³J = 6.44 Hz, 2H, CH₂), 2.67-2.76 (m, 6H, CH₂), 4.19 (t, ³J = 6.95 Hz, 2H, CH₂), 4.27-4.31 (m, 10H, CH, CH₂), 7.29-7.88 (m, 19H, CH, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.1 (CH₃), 22.4, 27.9, 28.0, 38.9, 39.3 (CH₂), 46.7 (CH), 65.6, 66.3 (CH₂), 120.0 (CH), 125.3 (C_q), 127.0, 127.6 (CH), 128.2, 132.0, 140.7, 143.1, 143.9 (C_q), 155.9, 170.6, 173.8 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3320 m, 2964 s, 1709 m, 1526 m, 1449 w, 1413 w, 1261 s, 1097 s, 1020 s, 800 s; **HR-MS** (pos. ESI): m/z: berechnet 816.362—816.362 gemessen für C₄₉H₅₁N₃O₇ + Na⁺.

6.4.2 Synthese des Rezeptors 80

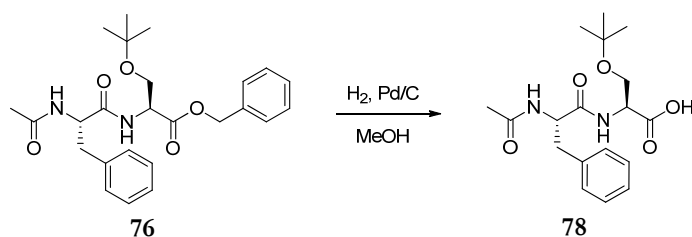
Synthese der Verbindung 76



Ac-Phe-OH **154** (500 mg, 2.41 mmol, 1.00 Äq.) und H-Ser(*t*Bu)-OPhe·HCl **155** (694 mg, 2.41 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 10 ml Dichlormethan/Dimethylformamid (1/1) gelöst, mit 2,4,6-Trimethylpyridin (959 µl, 7.24 mmol, 3.00 Äq.) und HCTU (1.20 g, 2.90 mmol, 1.20 Äq.) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Dichlormethan destillativ unter vermindertem Druck entfernt und 200 ml eisgekühltes Wasser zur verbleibenden Lösung unter Rühren gegeben, wobei ein hochviskoses Öl ausfiel. Die wässrige Lösung wurde abdekantiert und der verbleibende Rückstand lyophilisiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 50 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, isokratisch Methanol/Wasser 65/35) gereinigt. Produkt **76** wurde in einer Ausbeute von 94 % (998 mg, 2.27 mmol) als farbloses hochviskoses Öl erhalten.

C₂₅**H**₃₂**N**₂**O**₅: 440.532 g·mol⁻¹; **Smp** = 79.6 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.09 (s, 9H, CH₃), 1.72 (s, 3H, CH₃), 2.68 (dd, ²J = 14.0 Hz, ⁴J = 10.3 Hz, 1H, CH₂), 2.98 (dd, ²J = 14.01 Hz, ⁴J = 4.05 Hz, 1H, CH₂), 3.52 (dd, ²J = 9.25 Hz, ⁴J = 4.55 Hz, 1H, CH₂), 3.68 (dd, ²J = 9.25 Hz, ⁴J = 4.70 Hz, 1H, CH₂), 4.50-4.53 (m, 1H, CH), 4.62-4.67 (m, 1H, CH), 5.15 (dd, ²J = 35.8 Hz, ⁴J = 12.7 Hz, 2H, CH₂) 7.15-7.26 (m, 5H, CH), 7.32-7.39 (m, 5H, CH), 8.10 (d, ³J = 8.45 Hz, 1H, NH), 8.31 (d, ³J = 7.80 Hz, 1H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 22.4, 27.0 (CH₃), 37.4 (CH₂), 52.9, 53.4 (CH), 61.5, 65.9 (CH₂), 72.9 (C_q), 126.2, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 129.1 (CH), 135.9, 138.0 (C_q), 169.0, 170.1, 171.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3275 w, 2972 w, 1743 m, 1644 s, 1362 m, 1185 m, 956 w, 742 s, 694 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 463.220—gemessen 463.227 für C₂₅H₃₂N₂O₅ + Na⁺.

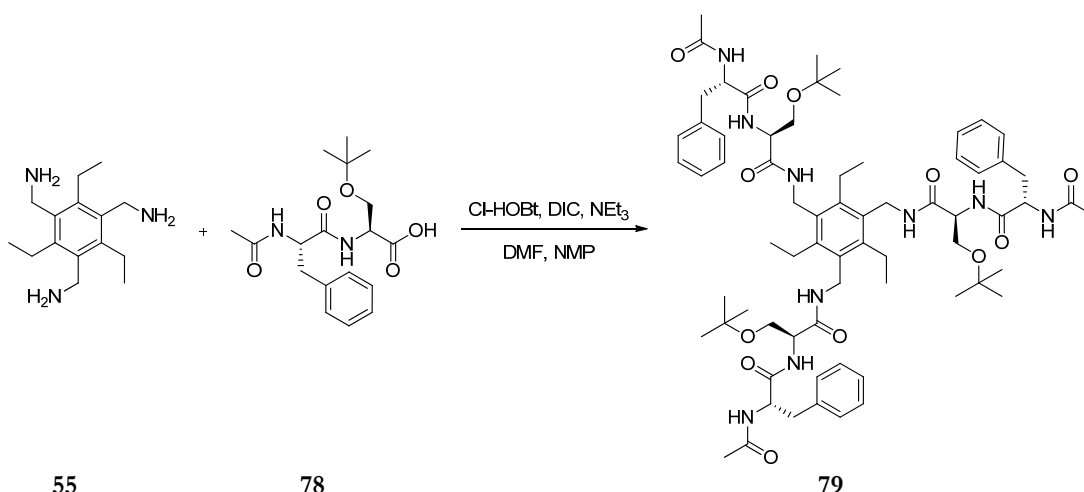
Synthese der Verbindung 78



Edukt **76** (530 mg, 1.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 5.3 ml Methanol gelöst, unter Argonatmosphäre mit Pd/C (128 mg, 0.120 mmol, 10 % reines Pd) versetzt und anschließend bei Raumtemperatur für 1 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wurde die Pd/C über einen Membranfilter (Nylon, 0.45 μm) abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Filtrat destillativ unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das Produkt **78** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 100 % (421 mg, 1.20 mmol) erhalten.

C₁₈H₂₆N₂O₅: 350.409 g·mol⁻¹; **Smp** = 145 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.12 (s, 9H, CH₃), 1.73 (s, 3H, CH₃), 2.70 (dd, ²*J* = 13.9 Hz, ⁴*J* = 10.4 Hz, 1H, CH₂), 3.03 (dd, ²*J* = 13.9 Hz, ⁴*J* = 4.04 Hz, 1H, CH₂), 3.17 (s, 3H, CH₃), 3.52 (dd, ²*J* = 9.23 Hz, ⁴*J* = 4.33 Hz, 1H, CH₂), 3.65 (dd, ²*J* = 9.23 Hz, ⁴*J* = 4.90 Hz, 1H, CH₂), 4.33-4.36 (m, 1H, CH), 4.59-4.64 (m, 1H, CH), 7.16-7.29 (m, 5H, CH), 8.06 (d, ³*J* = 8.08 Hz, 1H, NH), 8.11 (d, ³*J* = 8.66 Hz, 1H, NH), 12.77 (br.s, 1H, OH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 22.4, 27.2 (CH₃), 37.4 (CH₂), 52.9, 53.5 (CH), 61.5 (CH₂), 72.8 (C_q), 126.1, 127.9, 129.2 (CH), 138.1 (C_q), 169.0, 171.5, 171.5 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3286 br, 2969 w, 1717 m, 1647 s, 1539 s, 1363 s, 1189 s, 1101 m, 982 w, 698 s; **HR-MS** (neg. ESI) *m/z* = berechnet 349.177—gemessen 349.185 für C₁₈H₂₅N₂O₅⁻.

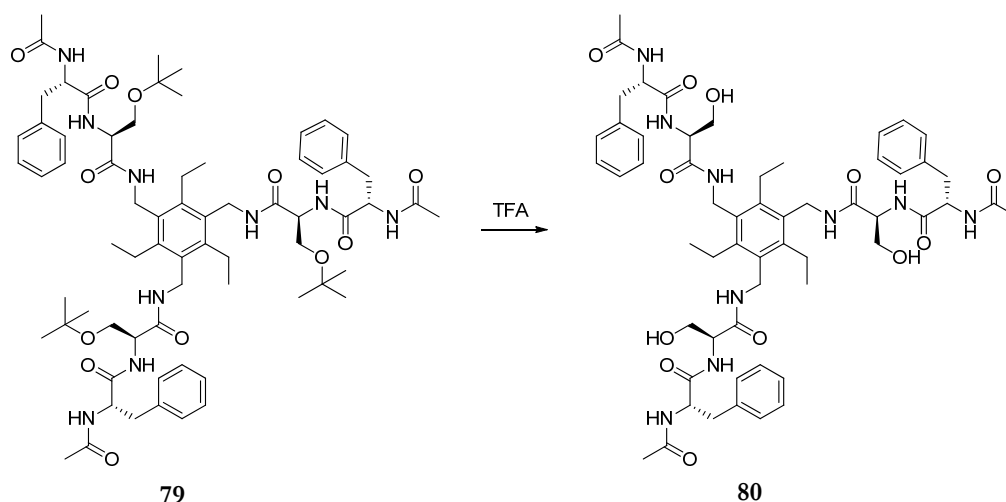
Synthese der Verbindung 79



Edukt **78** (231 mg, 0.660 mmol, 6.60 Äq.) wurde in 1 ml Dimethylformamid/N-Methylpyrrolidin (8/2) gelöst, mit DIC (93.0 µl, 0.600 mmol, 6.00 Äq.), Cl-HOBt (102 mg, 0.600 mmol, 6.00 Äq.), Triamin **55** (25.0 mg, 0.100 mmol, 1.00 Äq.) versetzt und anschließend für 4 h auf 96 °C Badtemperatur erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde diese mit 75 ml eisgekühltem Wasser unter Rühren versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen. Der erhaltene orange-braune Feststoff wurde chromatographisch (MPLC, SiO₂, 50 µm, 50 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, isokratisch Dichlormethan/Methanol 9.2/0.8) gereinigt. Produkt **79** wurde in einer Ausbeute von 79 % (98.0 mg, 0.079 mmol) erhalten.

C₆₉H₉₉N₉O₁₂: 1246.577 g·mol⁻¹; **Smp** > 250 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.05-1.10 (m, 36H, CH₃), 1.72 (s, 9H, CH₃), 2.63-2.72 (m, 9H, CH₂), 2.96 (dd, ²J = 13.9 Hz, ⁴J = 4.38 Hz, 3H, CH₂), 3.40-3.46 (m, 6H, CH₂), 4.24-4.27 (m, 3H, CH), 4.33-4.38 (m, 6H, CH₂), 4.50-4.55 (m, 3H, CH), 7.15-7.25 (m, 15H, CH), 7.74 (t, ³J = 4.18 Hz, 3H, NH), 7.90 (d, ³J = 8.02 Hz, 3H, NH), 8.11 (d, ³J = 8.69 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.1, 22.4 (CH₃), 23.2 (CH₂), 27.1 (CH₃), 37.3 (CH₂), 52.9, 53.8 (CH), 61.8, 67.4 (CH₂), 72.7 (C_q), 126.1, 127.9, 129.1, 131.6, 131.7 (CH), 137.9, 143.4 (C_q), 169.1, 169.3, 171.1 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3280 br, 2969 w, 2929 w, 1633 s, 1533 s, 1364 m, 1281 w, 1083 m, 874 w, 697 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1268.731—gemessen 1268.862 für C₆₉H₉₉N₉O₁₂ + Na⁺.

Synthese des Rezeptors 80

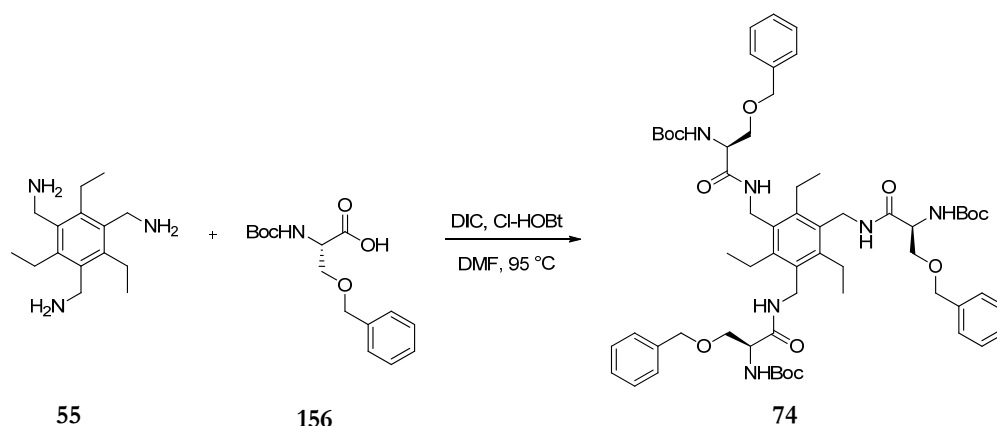


Edukt **79** (42.0 mg, 0.034 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Trifluoressigsäure (1.26 ml, 16.4 mmol) gelöst und bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 10 ml Wasser versetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert, gründlich gewaschen und über Orangel gel im Exsikkator getrocknet. Das Produkt **80** wurde in einer Ausbeute von 72 % (26.0 mg, 0.024 mmol) erhalten.

C₅₇H₇₅N₉O₁₂: 1078.258 g·mol⁻¹; **Smp** = 226 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.07 (t, ³J = 7.19 Hz, 9H, CH₃), 1.72 (s, 9H, CH₃), 2.63-2.72 (m, 9H, CH₂), 2.97 (dd, ²J = 14.0 Hz, ⁴J = 4.02 Hz, 3H, CH₂), 3.52-3.58 (m, 6H, CH₂), 4.24-4.37 (m, 9H, CH, CH₂), 4.50-4.55 (m, 3H, CH), 4.86 (br.s, 3H, OH), 7.15-7.25 (m, 15H, CH), 7.74 (t, ³J = 4.58 Hz, 3H, NH), 8.02 (d, ³J = 8.05 Hz, 3H, NH), 8.07 (d, ³J = 8.42 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.1, 22.4 (CH₃), 37.5 (CH₂), 53.9, 54.7 (CH), 61.7 (CH₂), 126.1, 128.0, 129.1 (CH), 131.8, 138.0, 143.5 (C_q), 169.1, 169.6, 171.3 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3273 m, 1630 s, 1531 s, 1454 m, 1372 m, 1220 m, 1054 m, 950 w, 741 m, 697 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1100.543—gemessen 1100.647 für C₅₇H₇₅N₉O₁₂ + Na⁺.

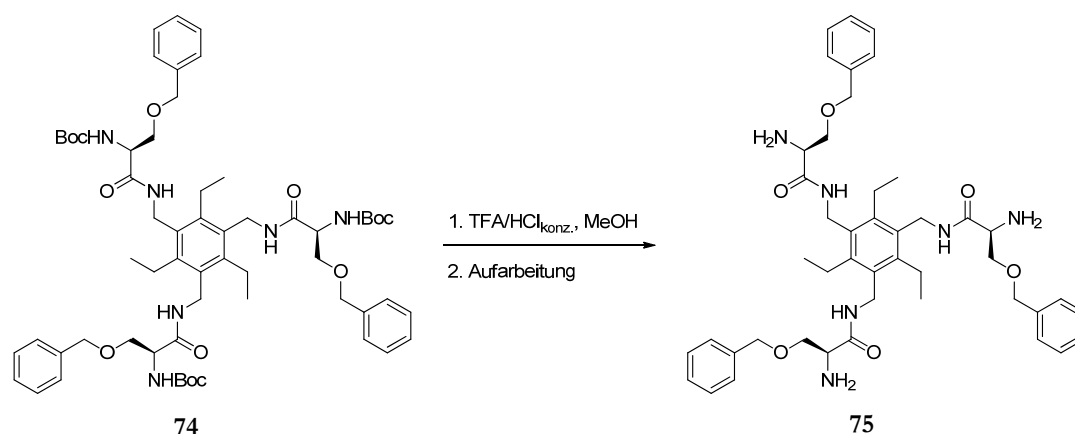
6.4.3 Synthesen der Rezeptoren **75**, **85**, und **86**

Synthese der Verbindung **74**



Boc-Ser(Bzl)-OH **156** (4.74 g, 16.0 mmol, 4.00 Äq.), DIC (2.62 g, 2.50 ml, 16.0 mmol, 4.00 Äq.) und Cl-HOBt (2.72 g, 16.04 mmol, 4.00 Äq.) wurden in 20 ml DMF gelöst und nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde Triamin **55** (2.00 g, 4.01 mmol, 1.00 Äq.) zur Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 2.5 h bei 95 °C Badtemperatur erhitzt und nach dem Abkühlen unter Rühren mit 380 ml eisgekühltem Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, SiO₂, 50 µm, 50 x 5 cm, 220 nm, 80 ml·min⁻¹, isokratisch Dichlormethan/Methanol 9.7/0.3) gereinigt. Produkt **74** wurde in einer Ausbeute von 81 % (3.50 g, 3.24 mmol) als hellbeiger Feststoff erhalten.

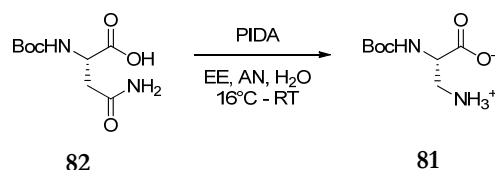
C₆₀H₈₄N₆O₁₂: 1081.342 g·mol⁻¹; **Smp** = 165-166 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ = 1.10 (t, ³J = 7.65 Hz, 9H, CH₃), 1.39 (s, 27H, CH₃), 2.57 (q, ³J = 7.53 Hz, 6H, CH₂), 3.52-3.55 (m, 3H, CH₂), 3.86-3.88 (m, 6H, CH₂), 4.21 (br.s, 3H, NH), 4.33-4.38 (m, 3H, CH₂), 4.45 (dd, ²J = 24.7 Hz, ⁴J = 11.8 Hz, 6H, CH₂), 4.50-4.53 (m, 3H, CH₂), 5.32 (br.s, 3H, NH), 6.18 (br.s, 3H, NH), 7.14-7.17 (m, 6H, CH), 7.26-7.27 (m, 9H, CH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, CDCl₃) δ = 16.4 (CH₃), 22.9 (CH₂), 28.3 (CH₃), 38.3 (CH₂), 54.1 (CH), 70.0, 73.6 (CH₂), 80.4 (C_q), 127.8, 128.1, 128.6 (CH), 131.9, 137.3, 144.5 (C_q), 155.5, 170.0 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3310 m, 1690 s, 1642 s, 1523 s, 1364 m, 1303 m, 1168 s, 1103 m, 864 m, 733 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1103.604—gemessen 1103.614 für C₆₀H₈₄N₆O₁₂ + Na⁺.

Synthese des Rezeptors **75**

Edukt **74** (3.18 g, 2.94 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Tetrahydrofuran gelöst, anschließend mit konzentrierter Salzsäure (8.00 ml, 265 mmol, 90.0 Äq.) und Trifluoressigsäure (6.80 ml, 88.2 mmol, 30.0 Äq.) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels HPLC (YMC-Pack ODS-A, 150 x 3.00 mm i. d., 5 µm, 12 nm, 0.43 ml·min⁻¹, Gradient 10 % bis 100 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz in 8.00 min, 100 % Methanol für 8.00 min, Produktpeak nach 10.2 min). Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde das Lösemittel destillativ entfernt und das erhaltene Rohprodukt chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 60 % bis 100 % in 25 min) gereinigt. Produkt **75** wurde als hellbeiges TFA-Salz in einer Ausbeute von 44 % (1.46 g, 1.30 mmol) erhalten. Um das freie Amin von **75** zu erhalten wurde das TFA-Salz mit Ionentauscher Amberjet 4200 behandelt.

C₄₅H₆₀N₆O₆: 780.995 g·mol⁻¹; **Smp** = 195 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.05 (t, ³J = 7.08 Hz, 9H, CH₃), 2.59-2.67 (m, 6H, CH₂), 3.77 (d, ³J = 4.70 Hz, 6H, CH₂), 4.08-4.11 (m, 3H, CH), 4.30-4.39 (m, 6H, CH₂), 4.52 (dd, ²J = 32.2 Hz, ⁴J = 12.2 Hz, 6H, CH₂), 7.27-7.35 (m, 15H, CH), 8.42 (d, ³J = 3.85 Hz, 9H, NH₃⁺), 8.66 (t, ³J = 4.00 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0 (CH₃), 22.6, 37.7 (CH₂), 52.1 (CH), 68.4, 72.3, (CH₂), 127.5, 127.6, 128.2 (CH), 131.1, 137.6, 143.6 (C_q), 166.1 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3032 w, 2830 w, 1671 s, 1584 m, 1453 m, 1271 w, 1069 s, 1001 w, 736 s, 697 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 781.465—gemessen 781.471 für C₄₅H₆₀N₆O₆⁺.

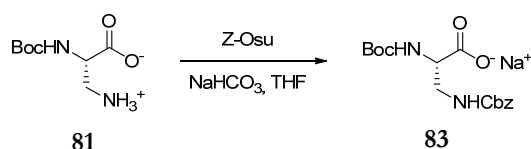
Synthese der Verbindung 81



Zu einer Suspension von Boc-geschütztem Asparagin **82** (10.0 g, 43.1 mmol, 1.00 Äq.) in Essigester (48 ml), Acetonitril (48 ml) und Wasser (24 ml) wurde PIDA (16.6 g, 51.6 mmol, 1.20 Äq.) gegeben. Die erhaltene Suspension wurde zunächst 30 min bei 16 °C und anschließend 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene feine weiße Niederschlag wurde abfiltriert, gut mit Diethylether gewaschen und im Vakuum über Orangegel getrocknet. Das Produkt **81** wurde in einer Ausbeute von 78 % (33.4 mmol, 6.82 g) erhalten.

C₈H₁₆N₂O₄: 204.224 g·mol⁻¹; **Smp** = 211 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.38 (s, 9H, CH₃), 2.70-3.04 (m, 2H, CH₂), 3.59-3.64 (m, 1H, CH) 6.15 (d, ³J = 4.44 Hz, 1H, NH), 8.20 (br.s, 3H, NH₃⁺); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 28.1 (CH₃), 40.6 (CH₂), 51.0 (CH), 78.1 (C_q), 155.1, 171.0 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3345 s, 2973 m, 2927 m, 1686 vs, 1531 vs, 1365 m, 1287 m, 1174 m, 846 w, 629 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 227.100—gemessen 227.106 für C₈H₁₆N₂O₄ + Na⁺.

Synthese der Verbindung 83

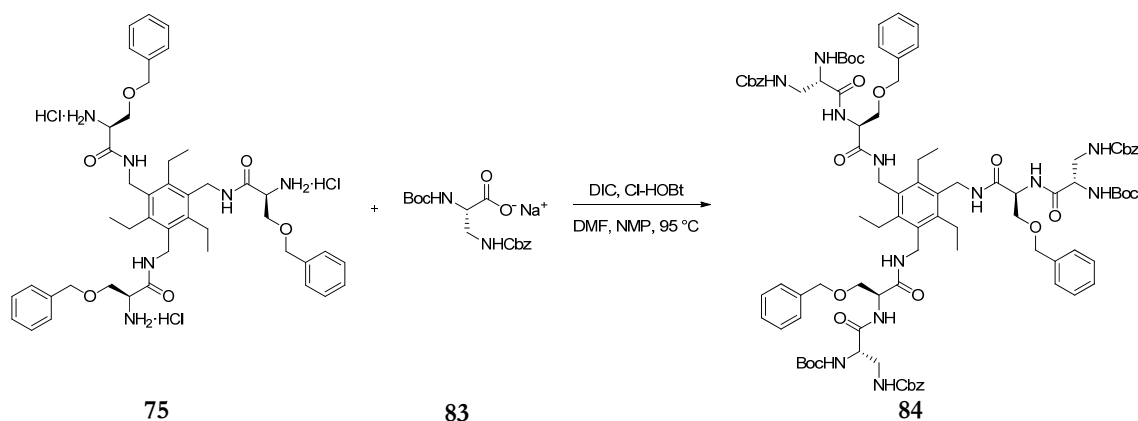


In 20 ml NaHCO₃-Lösung (2.47 g, 29.4 mmol, 3.00 Äq.) und 5 ml THF wurde Edukt **81** (2.00 g, 9.79 mmol, 1.00 Äq.) gelöst und zu dieser Lösung Z-Osu (2.93 g, 11.8 mmol, 1.20 Äq.) in 5 ml THF gelöst getropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösemittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 10 % bis 30 % in 30 min) gereinigt und Produkt **83** wurde in einer Ausbeute von 97 % (3.43 g, 9.52 mmol) erhalten.

C₁₆H₂₁N₂NaO₆: 360.338 g·mol⁻¹; **Smp** = 112-114 °C; **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.36 (s, 9H, CH₃), 3.20-3.33 (m, 2H, CH₂), 3.65 (q, ³J = 5.98 Hz, 1H, CH), 5.00 (s, 2H, CH₂), 6.04 (d, ³J = 6.19 Hz, 1H, NH), 6.95 (t, ³J = 4.70 Hz, 1H, NH), 7.26-7.35 (m, 5H, CH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 28.2 (CH₃), 43.7 (CH₂), 54.4 (CH), 65.1 (CH₂), 77.6 (C_q),

127.6, 127.7, 128.3 (CH), 137.3 (C_q), 155.0, 155.8, 172.3 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3358 w, 1698 m, 1669 m, 1510 s, 1369 w, 1302 w, 1254 s, 1143 m, 1104 m, 1012 m, 699 s; **HR-MS** (neg. ESI) m/z = berechnet 337.141—gemessen 337.140 für C₁₆H₂₁N₂O₆⁻.

Synthese der Verbindung 84

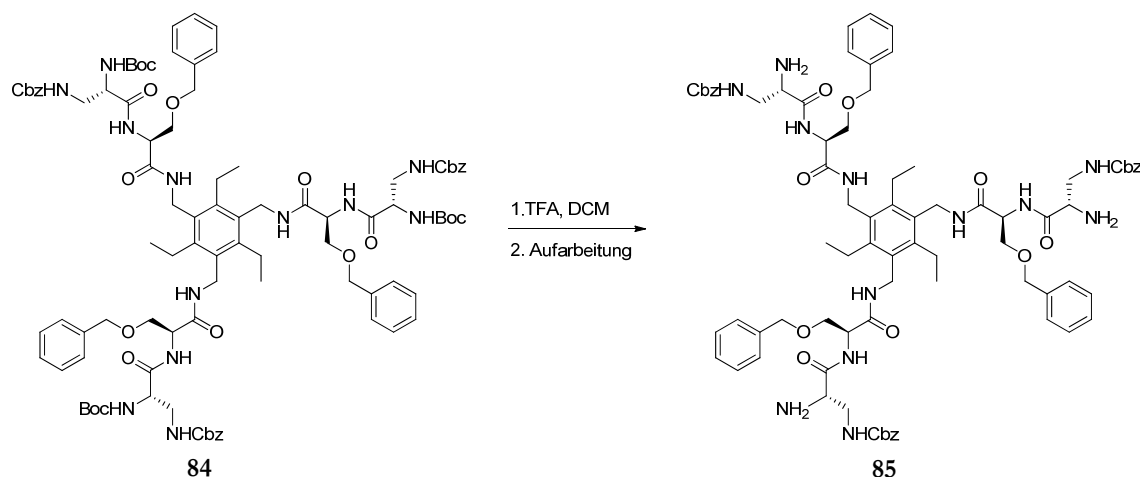


Edukt **83** (962 mg, 2.67 mmol, 6.00 Äq.) wurde in 8 ml DMF und 2 ml NMP gelöst und anschließend mit Cl-HOBt (453 mg, 2.67 mmol, 6.00 Äq.) und DIC (416 µl, 2.67 mmol, 6.00 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt bevor Ammoniumsalz **75** (500 mg, 0.445 mmol, 1.00 Äq.) und DIPEA (251 µl, 1.47 mmol, 3.30 Äq.) zugegeben wurden. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 3 h bei 95 °C Badtemperatur erhitzt. Nachdem die Lösung abgekühlt war wurden unter Rühren 200 ml eisgekühltes Wasser zugegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend chromatographisch (MPLC, SiO₂, 50 µm, 50 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, isokratisch Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 9.5/0.5/0.1 %) gereinigt. Produkt **84** konnte als hellgelber Feststoff in einer Ausbeute von 77 % (597 mg, 343 µmol) erhalten werden.

C₉₃H₁₂₀N₁₂O₂₁: 1742.016 g·mol⁻¹; **Smp** = 217–218 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.00 (t, ³J = 7.25 Hz, 9H, CH₃), 1.35 (s, 27H, CH₃), 2.57–2.63 (m, 6H, CH₂), 3.17–3.22 (m, 3H, CH₂), 3.27–3.31 (m, 3H, CH₂), 3.52–3.60 (m, 6H, CH₂), 4.04–4.09 (m, 3H, CH), 4.19–4.21 (m, 3H, CH₂), 4.36–4.38 (m, 3H, CH₂), 4.44 (dd, ²J = 15.1 Hz, ⁴J = 12.4 Hz, 6H, CH₂), 4.53–4.57 (m, 3H, CH), 4.99 (dd, ²J = 15.5 Hz, ⁴J = 12.7 Hz, 6H, CH₂), 6.94 (d, ³J = 7.50 Hz, 3H, NH), 7.18 (t, ³J = 5.32 Hz, 3H, NH), 7.25–7.34 (m, 30H, CH), 7.85 (d, ³J = 7.38 Hz, 3H, NH), 7.99 (br.s, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.0 (CH₃), 22.4 (CH₂), 28.1 (CH₃), 37.3, 42.1 (CH₂), 52.1, 54.8 (CH), 65.4, 70.0, 72.0 (CH₂), 78.5 (C_q), 127.4, 127.6, 127.7, 128.1, 128.3 (CH), 131.6, 137.0, 138.1, 143.6 (C_q), 155.2, 156.2, 169.0, 169.9 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] =

3293 m, 2972 w, 2930 w, 1686 s, 1635 s, 1518 s, 1365 m, 1256 s, 1162 s, 904 w, 734 s, 695 s;
HR-MS (pos. ESI) m/z = berechnet 1764.862—gemessen 1764.862 für $C_{93}H_{120}N_{12}O_{21} + Na^+$.

Synthese des Rezeptors **85**



Edukt **84** (769 mg, 0.441 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 16 ml Dichlormethan suspendiert und anschließend mit Trifluoressigsäure (3.06 ml, 39.7 mmol, 90.0 Äq.) versetzt. Die Umsetzung der anschließend klaren Lösung wurde per HPLC (YMC-Pack ODS-A, 150 x 3.00 mm i. d., 5 μ m, 12 nm, 0.43 ml·min⁻¹, Gradient 70 % bis 100 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz in 8.00 min, Produktpeak nach 4.98 min) verfolgt. Nach Rühren über Nacht wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und das erhaltene braune Öl chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 50 μ m, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 80 % bis 100 % in 25 min) gereinigt. Mittels Ionentauscher Amberlit 42000 konnte aus dem als TFA-Salz isolierten Produkt das freie Amin erhalten werden. Produkt **85** konnte als freies Amin in einer Ausbeute von 77 % (490 mg, 0.340 mmol) erhalten werden.

C₇₈H₉₆N₁₂O₁₅: 1441.668 g·mol⁻¹; **Smp** = 212 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 0.98 (t, ³J = 7.06 Hz, 9H, CH₃), 2.58-2.63 (m, 6H, CH₂), 3.43-3.46 (m, 6H, CH₂), 3.58-3.65 (m, 6H, CH₂), 4.00 (br.s, 3H, CH), 4.26-4.34 (m, 6H, CH₂), 4.44 (dd, ²J = 21.2 Hz, ⁴J = 12.2 Hz, 6H, CH₂), 4.61-4.64 (m, 3H, CH), 5.02 (s, 6H, CH₂), 7.25-7.36 (m, 30H, CH), 8.18 (br.s, 3H, NH), 8.29 (br.s, 9H, NH₃⁺), 8.84 (d, ³J = 7.75 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.0 (CH₃), 22.4, 37.6, 42.6 (CH₂), 52.1, 52.9 (CH), 65.7, 69.9, 72.1 (CH₂), 127.4, 127.4, 127.8, 127.9, 128.2, 128.3 (CH), 131.5, 136.7, 138.0, 143.6 (C_q), 156.3, 166.8, 168.6 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3285 w, 2873 w, 1640 s, 1525 s, 1375 w, 1263 m, 1202 m, 1123 m, 835 w, 695 s;
HR-MS (pos. ESI) m/z = berechnet 1441.719—gemessen 1441.745 für $C_{78}H_{97}N_{12}O_{15}^+$.

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **85** to compound **86**.

Compound **85** (left) is a complex molecule featuring a central benzene ring substituted with two ethyl groups and two side chains. One side chain is a 2-((benzyloxymethyl)amino)-3-((benzyloxymethyl)amino)propanoate derivative, and the other is a 2-((benzyloxymethyl)amino)-3-((benzyloxymethyl)amino)propanoate derivative.

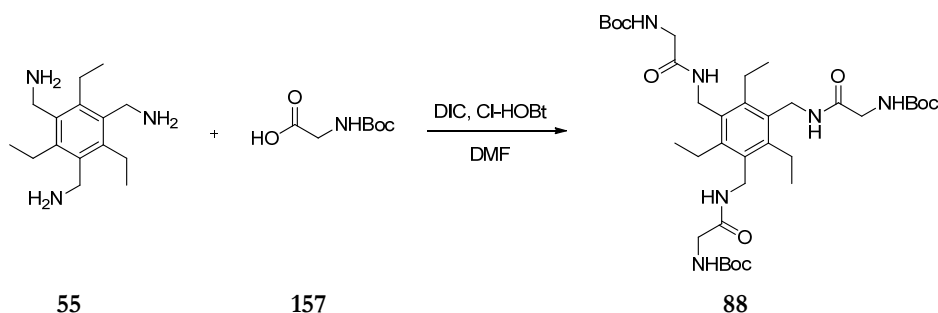
The reaction conditions are Pd/C, H_2 in DCM, MeOH .

Compound **86** (right) is the product, where the side chains have been converted to their corresponding diamine salts, specifically 2-((benzyloxymethyl)amino)-3-((benzyloxymethyl)amino)propanoate hydrochloride salts.

C₅₄H₈₄Cl₆N₁₂O₉: 1258.038 g·mol⁻¹; **Smp** = 174 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.03 (t, ³J = 7.55 Hz, 9H, CH₃), 2.55-2.64 (m, 6H, CH₂), 3.21-3.31 (m, 6H, CH₂), 3.63-3.71 (m, 6H, CH₂), 4.25-4.36 (m, 9H, CH, CH₂), 4.47 (dd, ²J = 30.5 Hz, ⁴J = 12.0 Hz, 6H, CH₂), 4.60-4.63 (m, 3H, CH), 7.27-7.34 (m, 15H, CH), 8.25 (br.s, 18H, NH₃⁺), 8.38 (br.s, 3H, NH), 8.91 (d, ³J = 5.86 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.0 (CH₃), 22.4, 37.8 (CH₂), 50.2, 53.3 (CH), 69.6, 72.1 (CH₂), 127.4, 127.6, 128.2 (CH), 131.3, 137.8, 143.8 (C_q), 158.3, 169.0 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3193 br, 2969 br, 1715 m, 1637 s, 1539 s, 1365 m, 1216 m, 1038 w, 840 w, 609 s.

6.4.4 Synthesen der Vergleichsrezeptoren 89 und 87

Synthese der Verbindung 88

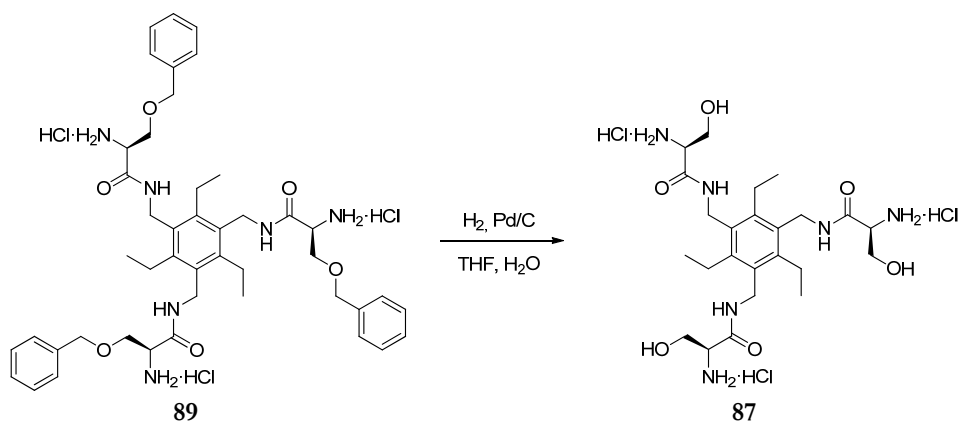


Boc-Glycin **157** (2.81 g, 16.0 mmol, 4.00 Äq.), Cl-HOBt (2.72 g, 16.0 mmol, 4.00 Äq.) und DIC (2.02 g, 16.0 mmol, 4.00 Äq.) wurden in 20 ml DMF gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Triamin **55** (2.00 g, 4.01 mmol, 1.00 Äq.) zur Reaktionslösung gegeben und diese bei 95 °C Badtemperatur für 3.5 h erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit 380 ml eisgekühltem Wasser unter Rühren versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, SiO₂, 50 µm, 80 x 5 cm, 220 nm, 80 ml·min⁻¹, isokratisch Dichlormethan/Methanol/Triethylamin 9.5/0.5/0.1 %) gereinigt. Produkt **88** wurde in einer Ausbeute von 56 % (1.63 g, 2.26 mmol) erhalten.

C₃₆H₆₀N₆O₉; 720.896 g·mol⁻¹; **Smp** = 93-95 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.08 (t, ³J = 7.03 Hz, 9H, CH₃), 1.36 (s, 27H, CH₃), 2.66 (q, ³J = 7.04 Hz, 6H, CH₂), 3.52 (d, ³J = 5.80 Hz, 6H, CH₂), 4.30 (d, ³J = 4.28 Hz, 6H, CH₂), 6.90 (t, ³J = 6.05 Hz, 3H, NH), 7.64 (br.s, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.1 (CH₃), 22.4 (CH₂), 28.2 (CH₃), 37.0, 43.0 (CH₂), 78.0 (C_q), 132.0, 143.3 (C_q), 155.7, 168.9 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 2359 m, 1649 s, 1503 m, 1290 m, 1161 m, 847 m, 634 m, 616 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 743.431—gemessen 743.660 für C₃₆H₆₀N₆O₉ + Na⁺.

C₂₁H₃₉Cl₃N₆O₃: 529.932 g·mol⁻¹; **Smp** > 270 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.10 (t, ³J = 7.46 Hz, 9H, CH₃), 2.69 (q, ³J = 7.46 Hz, 6H, CH₂), 3.52 (s, 6H, CH₂), 4.37 (d, ³J = 4.35 Hz, 6H, CH₂), 8.26 (br.s, 9H, NH₃⁺), 8.55 (t, ³J = 4.41 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.1 (CH₃), 22.6, 37.2, 40.0 (CH₂), 131.5, 143.4 (C_q), 165.5 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3287 m, 2893 m, 2639 w, 1662 s, 1589 w, 1539 s, 1493 m, 1444 w, 1400 w, 1253 m, 1003 w, 929 w, 694 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 421.292—gemessen 421.299 für C₂₁H₃₇N₆O₃⁺.

Synthese der Verbindung 87

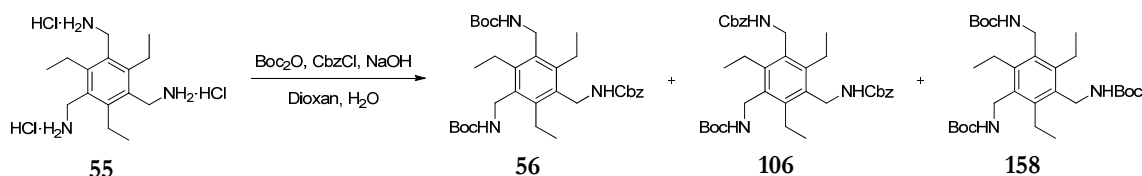


Edukt **89** (150 mg, 0.170 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 3 ml einer 1/1-Mischung aus Wasser und Tetrahydrofuran gelöst, unter Argonatmosphäre mit Pd/C (54.0 mg, 0.051 mmol, 10 % reines Pd pro Benzylgruppe) versetzt und anschließend für 72 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Umsetzung des Edukts wurde mittels HPLC-Kontrolle (Gradient 10 % bis 60 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz in 10.0 min, Produktpeak nach 9.03 min) verfolgt. Nach Abfiltrieren der Pd/C über einen Membranfilter (Nylon, 0.45 µm), Waschen mit Wasser und destillativer Entfernung des Lösemittels wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographisch (MPLC, RP18, 40 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 20 % bis 50 % in 30 min mit 0.05 % Zusatz TFA) gereinigt und zum Chloridsalz umgesalzen. Produkt **87** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 48 % (52.0 mg, 0.082 mmol) erhalten.

C₂₄H₄₅Cl₃N₆O₆: 620.010 g·mol⁻¹; **Smp** = 147 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.10 (t, ³J = 7.55 Hz, 9H, CH₃), 2.67 (q, ³J = 7.35 Hz, 6H, CH₂), 3.64-3.72 (m, 6H, CH₂), 3.78-3.81 (m, 3H, CH), 4.36 (d, ³J = 3.99 Hz, 6H, CH₂), 5.50 (br.s, 3H, OH), 8.15 (br.s, 9H, NH₃⁺), 8.41 (t, ³J = 4.02 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0 (CH₃), 22.4, 37.6 (CH₂), 54.1 (CH), 60.4 (CH₂), 131.3, 143.8 (C_q), 166.6 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3201 br, 2970 br, 1736 s, 1636 s, 1540 s, 1204 s, 1037 m, 899 w, 721 s, 620 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 511.324—gemessen 511.325 für C₂₄H₄₃N₆O₆⁺.

6.4.5 Synthesen der Rezeptoren 90 und 91

Synthese der Verbindungen 56 und 106



Das Triaminhydrochloridsalz **55** (660 mg, 1.84 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 30 ml Wasser und 40 ml Dioxan vorgelegt, mit Natriumhydroxid (243 mg, 6.06 mmol, 3.30 Äq.) versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurde Benzylchloroformiat (628 mg, 0.530 ml, 3.68 mmol, 2.00 Äq.) und Boc-Anhydrid (803 mg, 3.68 mmol, 2.00 Äq.), jeweils gelöst in 10 ml Dioxan, zusammen mit Natriumhydroxid (243 mg, 6.06 mmol, 3.30 Äq.) gelöst in 10 ml Wasser, gleichzeitig zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 4 h gerührt, bevor sie dreimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert wurde. Das Lösemittel der gesammelten organischen Phasen wurde im Vakuum eingeeengt und das so erhaltene gelbe Öl chromatographisch (Cyclohexan/Essigester/TEA 7.5/2.5/0.5) gereinigt. Produkt **56** wurde in einer Ausbeute von 23 % (261 mg, 0.423 mmol), Produkt **106** in einer Ausbeute von 16 % (172 mg, 0.294 mmol) und Produkt **158** in einer Ausbeute 14 % (142 mg, 0.258 mmol) erhalten.

Produkt **56**:

C₃₃H₄₉Cl₄N₃O₆: 583.759 g·mol⁻¹; **Smp** = 67–71 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.17–1.21 (m, 9H, CH₃), 1.45 (s, 18H, CH₃), 2.69–2.74 (m, 6H, CH₂), 4.33 (br.s, 6H, NH, CH₂), 4.42 (d, 3J = 4.4 Hz, 2H, CH₂), 4.55 (br.s, 1H, NH), 5.13 (s, 2H, CH₂), 7.34 (br.s, 5H, CH); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃) δ = 16.7 (CH₃), 23.1 (CH₂), 28.6 (CH₃), 39.9, 67.1 (CH₂), 79.7 (C_q), 128.2, 128.3, 128.7 (CH), 132.7, 136.6, 143.9 (C_q), 155.5, 155.9 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3343 s, 2975 s, 2932 m, 2874 w, 1685 s, 1519 s, 1391 w, 1365 m, 1247 s, 1167 s, 1045 m, 867 w, 773 w, 699 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 606.351–gemessen 606.351 C₃₆H₄₉N₃O₆ + Na⁺.

Produkt **106**:

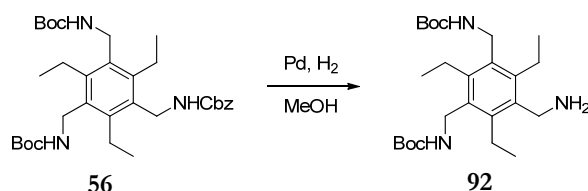
C₃₆H₄₇N₃O₆: 617.775 g·mol⁻¹; **Smp** = 71–74 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.45 (s, 9H, CH₃), 2.71 (q, 3J = 7.3 Hz, 6H, CH₂), 4.33 (br.s, 3H, NH, CH₂), 4.41 (d, 3J = 4.3 Hz, 4H, CH₂), 4.55 (br.s, 2H, NH), 5.12 (s, 4H, CH₂), 7.34 (br.s, 10H, CH); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃) δ = 16.6 (CH₃), 23.1 (CH₂), 28.5 (CH₃), 38.9, 39.4, 67.0 (CH₂), 79.7 (C_q), 128.2, 128.3, 128.6 (CH), 132.2, 132.7, 136.5, 145.0 (C_q), 155.5, 155.9 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3330 s,

2975 s, 2932 m, 2874 w, 1713 s, 1499 s, 1391 m, 1365 s, 1245 s, 1168 s, 1047 m, 867 m, 754 m, 698 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 640.335–gemessen 640.334 $C_{33}H_{47}N_3O_6 + Na^+$.

Produkt **158**:

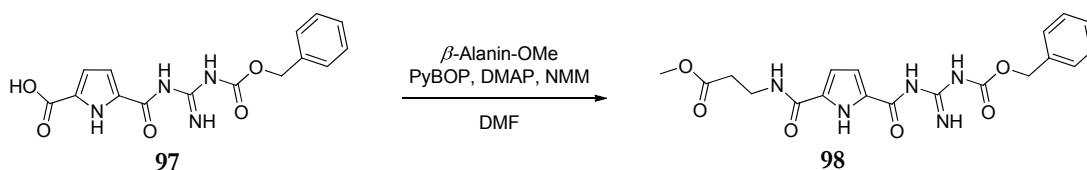
C₃₀H₅₁N₃O₆: 549.742 g·mol⁻¹; **Smp** = 71-74 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.18 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃), 1.44 (s, 27H, CH₃), 2.71 (q, ³*J* = 7.3 Hz, 6H, CH₂), 4.33 (br.s, 9H, NH, CH₂); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, DMSO) δ = 16.1 (CH₃), 22.4, 26.3 (CH₂), 28.2 (CH₃), 38.1 (CH₂), 77.7, 132.1, 142.7 (C_q), 155.2 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3345 br.s, 2964 w, 2928 w, 1644 s, 1547 s, 1385 w, 1233 s, 1046 w, 943 w, 610 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 572.367–gemessen 572.367 $C_{30}H_{51}N_3O_6 + Na^+$.

Synthese der Verbindung 92



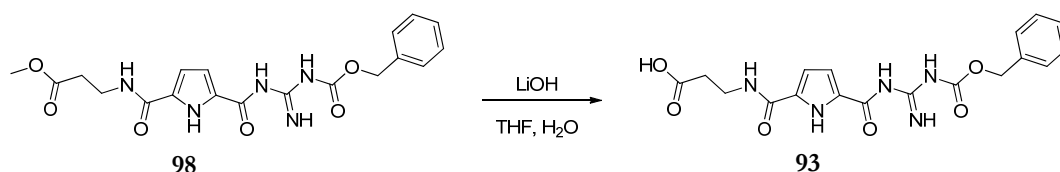
Edukt **56** (460 mg, 0.788 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 25 ml Methanol suspendiert und mit Pd/C (84.0 mg, 0.788 mmol, 1.00 Äq.) unter Argonatmosphäre versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert, mit Methanol gewaschen, das Filtrat destillativ unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit und der erhaltene Feststoff über Orangegel im Exsikkator getrocknet. Produkt **92** konnte in einer Ausbeute von 99 % (350 mg, 0.778 mmol) erhalten werden.

C₂₅H₄₃N₃O₄: 449.627 g·mol⁻¹; **Smp** = 84 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.04-1.12 (m, 9H, CH₃), 1.38 (s, 18H, CH₃), 2.61-2.74 (m, 6H, CH₂), 3.69 (t, ³*J* = 5.80 Hz, 2H, CH₂), 4.17 (d, ³*J* = 4.70 Hz, 4H, CH₂), 6.59 (br.s, 2H, NH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.6, 16.8 (CH₃), 22.5, 22.7 (CH₂), 28.6 (CH₃), 38.5, 39.4 (CH₂), 78.0, 132.3, 142.1, 142.2 (C_q) 155.6 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3346 m, 2973 s, 2873 m, 1706 s, 1500 s, 1365 s, 1248 s, 1168 s, 1046 m, 867 m, 593 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 472.315—gemessen 472.315 für $C_{25}H_{43}N_3O_4 + Na^+$.

Synthese der Verbindung **98**¹³⁶

Edukt **97**¹⁵⁸ (500 mg, 1.51 mmol, 1.00 Äq.), PyBOP (945 mg, 1.82 mmol, 1.20 Äq.), NMM (1.00 ml, 9.00 mmol, 5.96 Äq.) und DMAP (55.5 mg, 0.454 mmol, 0.300 Äq.) wurden in 8 ml Dimethylformamid gelöst, für 5 min gerührt und dann mit β -Alaninmethylester (254 mg, 1.82 mmol, 1.20 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 24 h gerührt, filtriert und anschließend mit 75 ml Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und über Orangegel im Exsikkator getrocknet. Produkt **98** wurde in einer Ausbeute von 70 % (440 mg, 1.06 mmol) erhalten.

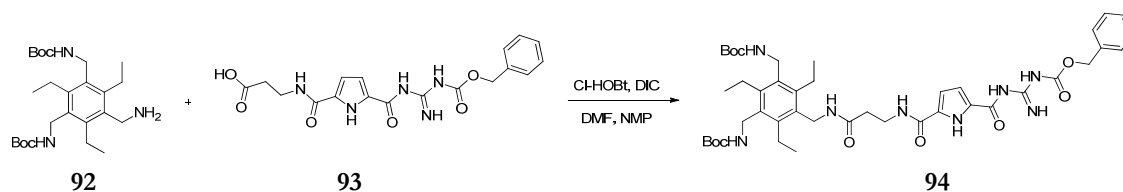
C₁₉**H**₂₁**N**₅**O**₆: 415.400 g·mol⁻¹; **Smp** = 140-141 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 2.56-2.60 (m, 2H, CH₂), 3.44-3.49 (m, 2H, CH₂), 3.61 (s, 3H, CH₃), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.78 (d, ³J = 2.76 Hz, 1H, CH), 6.96 (s, 1H, CH), 7.32-7.38 (m, 5H, CH), 8.47 (s, 1H, NH), 8.77 (br.s, 1H, NH), 9.36 (br.s, 1H, NH), 11.20 (br.s, 1H, NH), 11.80 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 33.6, 34.5 (CH₂), 51.4 (CH₃), 66.1 (CH₂), 111.9, 114.8, 127.6, 127.9, 128.4 (CH), 130.3, 136.6, 158.9, 159.5, 171.7 (C_q); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3391 br.s, 3322 br.s, 2954 w, 1739 s, 1626 s, 1553 s, 1442 m, 1259 s, 1082 m, 1045 w, 908 w, 748 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 438.138—gemessen 438.138 für C₁₉H₂₁N₅O₆ + Na⁺.

Synthese der Verbindung **93**¹³⁶

Edukt **98** (400 mg, 0.963 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 8 ml Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 2 ml Wasser und Lithiumhydroxid (46.1 mg, 1.93 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 3 h gerührt und nach erfolgter Reaktionskontrolle ein weiteres Äquivalent Lithiumhydroxid (23.1 mg, 0.963 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben woraufhin die Reaktion nach weiteren 5 min beendet war. Tetrahydrofuran wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt und die verbleibende Lösung zur Fällung des Produkts mit Salzsäure angesäuert. Produkt **93** wurde in einer Ausbeute von 96 % (371 mg, 0.924 mmol) erhalten.

C₁₈H₁₉N₅O₆: 401.373 g·mol⁻¹; **Smp** = 218 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 2.48-2.52 (m, 2H, CH₂), 3.41-3.45 (q, ³J = 6.25 Hz, 2H, CH₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.79-6.80 (m, 1H, CH), 6.99 (s, 1H, CH), 7.32-7.49 (m, 5H, CH), 8.47 (t, ³J = 2.72 Hz, 1H, NH), 8.82 (br.s, 1H, NH), 9.40 (br.s, 1H, NH), 11.72 (br.s, 1H, NH), 11.86 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 33.8, 35.1, 66.3 (CH₂), 111.9, 114.9, 127.6, 127.9, 128.4 (CH), 130.6, 136.5, 158.6, 159.5, 172.8 (C_q); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3331 s, 2953 w, 1692 s, 1558 s, 1270 s, 1133 m, 1045 w, 856 w, 750 m, 601 w; **HR-MS** (neg. ESI) m/z = berechnet 400.126—gemessen 400.126 für C₁₈H₁₈N₅O₆⁻.

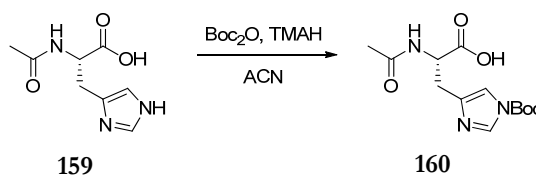
Synthese der Verbindung 94



Edukt **92** (300 mg, 0.667 mmol, 1.00 Äq.), Edukt **93** (348 mg, 0.867 mmol, 1.30 Äq.), DIC (135 µl, 0.867 mmol, 1.30 Äq.) und Cl-HOBt (147 mg, 0.867 mmol, 1.30 Äq.) wurden in 9 ml Dimethylformamid/N-Methylpyrrolidin (8/2) gelöst und anschließend für 3 h auf 55 °C erhitzt. Danach wurde die Reaktionslösung mit 150 ml Eiswasser versetzt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert und chromatographisch (MPLC, RP18, 120 g, 290 nm, 20 ml min⁻¹, Gradient Methanol 60 % bis 100 % in 45 min) gereinigt. Produkt **94** wurde in einer Ausbeute von 43 % (238 mg, 0.286 mmol) erhalten.

C₄₃H₆₀N₈O₉: 832.985 g·mol⁻¹; **Smp** = 147 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.04 (t, ³J = 7.36 Hz, 9H, CH₃), 1.38 (s, 18H, CH₃), 2.36 (t, ³J = 6.99 Hz, 2H, CH₂), 2.65-2.73 (m, 6H, CH₂), 3.44 (d, ³J = 5.96 Hz, 2H, CH₂), 4.18 (d, ³J = 4.65 Hz, 4H, CH₂), 4.37 (d, ³J = 4.04 Hz, 2H, CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.50 (s, 2H, NH), 6.76-6.77 (m, 1H, CH), 7.32-7.37 (m, 6H, CH), 7.84 (s, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, NH), 8.74 (br.s, 1H, NH), 9.31 (br.s, 1H, NH), 11.28 (br.s, 2H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.1, 16.2 (CH₃), 22.4 (CH₂), 28.2 (CH₃), 35.0, 37.1, 37.1, 38.1, 66.1 (CH₂), 77.7 (C_q), 111.8, 127.6, 127.8, 128.4 (CH), 131.7, 132.3, 142.7 (C_q), 155.2, 169.9 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3345 s, 2974 s, 2931 m, 2873 w, 1682 s, 1638 m, 1524 s, 1365 m, 1288 s, 1169 m, 1051 m, 758 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 833.456—gemessen 833.456 für C₄₃H₆₁N₈O₉⁺.

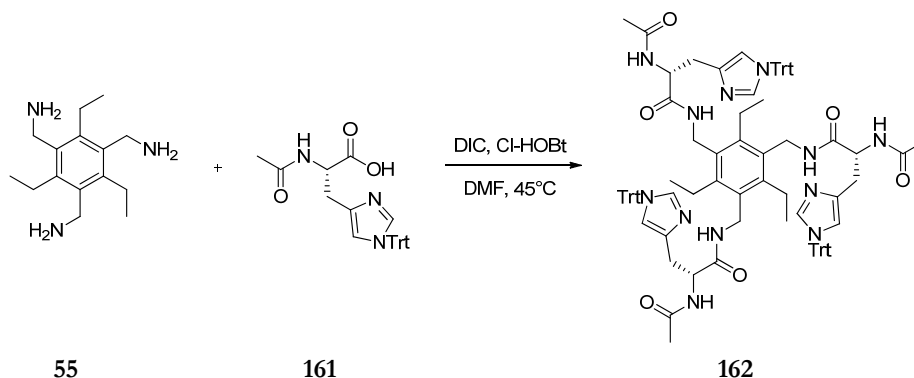
Synthese der Verbindung 160



Ac-His-OH **159** (3.66 g, 17.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10 ml 1 N Natriumhydroxidlösung (1.36 g, 34.0 mmol, 2.00 Äq.) gelöst, im Eisbad gekühlt und 10 ml einer Lösung von Boc-Anhydrid (4.08 g, 18.7 mmol, 1.10 Äq.) in Dioxan über 10 min zugetropft. Nach 15 min Rühren wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung dreimal mit 20 ml Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Produkt **160** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 7 % (352 mg, 1.18 mmol) erhalten.

C₁₃H₁₉N₃O₅: 297.307 g·mol⁻¹; **Smp** = 128 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.56 (s, 9H, CH₃), 1.80 (s, 3H, CH₃), 2.79 (dd, ²J = 14.8 Hz, ⁴J = 9.03 Hz, 1H, CH₂), 2.90 (dd, ²J = 10.3 Hz, ⁴J = 4.93 Hz, 1H, CH₂), 4.42-4.46 (m, 1H, CH), 7.25 (d, ³J = 0.92 Hz, 1H, NH), 8.08 (s, 1H, CH), 8.10 (d, ⁴J = 1.12 Hz, 1H, CH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 22.4, 27.4 (CH₃), 29.7 (CH₂), 51.6 (CH), 85.2 (C_q), 114.2, 136.7 (CH), 139.2, 146.7, 169.2, 173.0 (C_q); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3354 w, 2974 w, 1760 m, 1668 s, 1373 s, 1150 m, 1003 s, 771 s, 601 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 298.140—gemessen 298.144 für C₁₃H₂₀N₃O₅⁺.

Synthese von Verbindung 162

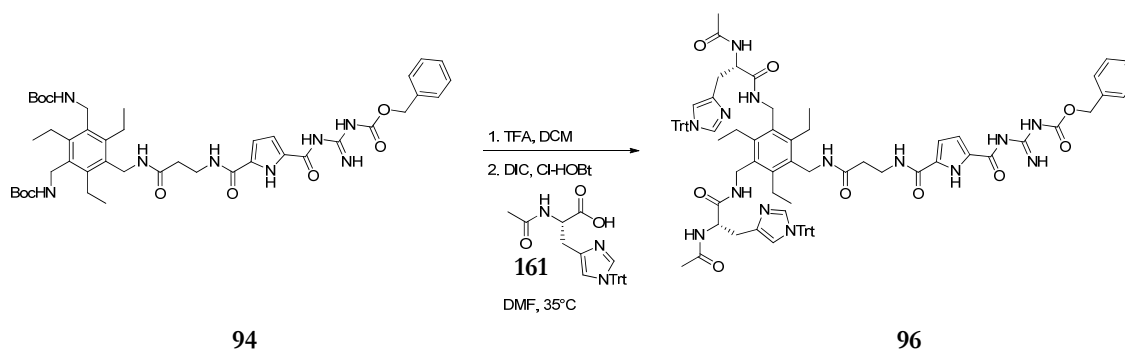


Ac-His(Trt)-OH **161** (397 mg, 0.903 mmol, 4.50 Äq.), DIC (140 µl, 0.903 mmol, 4.50 Äq.) und Cl-HOBt (153 mg, 0.903 mmol, 4.50 Äq.) wurden in 2 ml Dimethylformamid suspendiert. Anschließend wurde mit Triamin **55** (50.0 mg, 0.200 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und die Suspension bei 45 °C Ölbadtemperatur für 2 h erhitzt. Die klare orange-braune Lösung wurde

mit 100 ml Eiswasser versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und chromatographisch (MPLC, RP18, 50 g, 220 nm, 20 ml min⁻¹, Gradient Methanol 40 % bis 100 % in 35 min) gereinigt. Produkt **162** wurde in einer Ausbeute von 51 % (155 mg, 0.102 mmol) erhalten.

C₉₆H₉₆N₁₂O₆: 1513.866 g·mol⁻¹; **Smp** = 175.7 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 0.97 (t, ³J = 7.56 Hz, 9H, CH₃), 1.69 (s, 9H, CH₃), 2.54-2.58 (m, 6H, CH₂), 2.64 (dd, ²J = 14.5 Hz, ⁴J = 10.1 Hz, 3H, CH₂), 2.80 (dd, ²J = 14.8 Hz, ⁴J = 4.41 Hz, 3H, CH₂), 4.17-4.29 (m, 6H, CH₂), 4.47-4.51 (m, 3H, CH), 6.62 (s, 3H, CH), 7.03-7.05 (m, 19H, CH), 7.21 (d, ³J = 1.21 Hz, 3H, CH), 7.32-7.39 (m, 29H, CH), 7.80 (t, ³J = 4.19 Hz, 3H, NH), 7.92 (d, ³J = 8.60 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0, 22.4, (CH₃), 31.4, 52.2 (CH₂), 74.4 (C_q), 118.8, 128.0, 128.1, 129.2 (CH), 131.8 (C_q), 137.2 (CH), 142.3, 143.4 (C_q), 168.8, 171.0 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3265 w, 1646 m, 1490 m, 1443 m, 1371 w, 1234 w, 998 w, 746 m, 699 s, 611 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1536.765—gemessen 1536.450 für C₉₆H₉₆N₁₂O₆ + Na⁺.

Synthese der Verbindung 96



Edukt **94** (200 mg, 0.240 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2 ml Dichlormethan gelöst, mit Trifluoressigsäure (1.11 ml, 14.4 mmol, 60.0 Äq.) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie die vollständige Umsetzung des Edukts **94** nachgewiesen worden war, wurde die Reaktionslösung destillativ vom Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand chromatographisch (MPLC, RP18, 50 g, 290 nm, 20 ml min⁻¹, Gradient Methanol 0 % bis 100 % in 60 min) gereinigt und anschließend mit 1 N Salzsäure lyophilisiert. Produkt **95** wurde in einer Ausbeute von 95 % (161 mg, 0.228 mmol) erhalten und weiter umgesetzt. Verbindung **95** (161 mg, 0.228 mmol, 1.00 Äq.), Ac-His(Trt)-OH **161** (602 mg, 1.368 mmol, 6.00 Äq.), DIC (213 µl, 1.368 mmol, 6.00 Äq.) und Cl-HOBt (232 mg, 1.368 mmol, 6.00 Äq.) wurden in 3.60 ml Dimethylformamid gelöst. Die erhaltene Suspension wurde für 3 h auf 35 °C erhitzt. Anschließend wurde die orange-braune klare Lösung mit 200 ml Eiswasser versetzt, der erhaltene Niederschlag abfiltriert und chromatographisch (MPLC, RP18, 50 g, 290 nm, 20 ml min⁻¹, Gradient Methanol 70 % bis

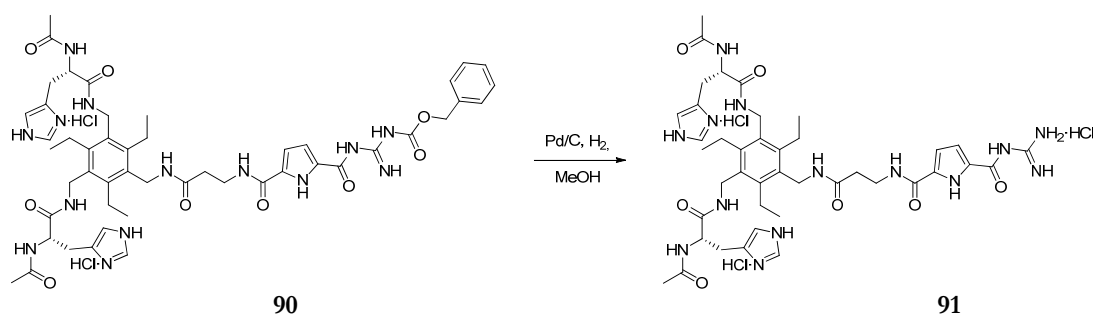
C₉₆H₉₆N₁₂O₆: 1513.866 g·mol⁻¹; **Smp** = 185.3 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.00 (t, ³J = 7.23 Hz, 9H, CH₃), 1.70 (s, 6H, CH₃), 2.34-2.37 (m, 2H, CH₂), 2.54-2.66 (m, 8H, CH₂), 2.76-2.81 (m, 2H, CH₂), 3.41-3.45 (m, 2H, CH₂), 3.47-3.51 (m, 1H, CH), 4.15-4.30 (m, 6H, CH₂), 4.47-4.60-4.52 (m, 2H, CH), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.62 (s, 2H, CH₂), 6.76-6.78 (m, 1H, CH), 7.03-7.05 (m, 13H, CH, NH), 7.20-7.21 (m, 2H, NH), 7.31-7.41 (m, 24H, CH, NH), 7.77 (br.s, 1H, NH), 7.90-7.94 (m, 3H, NH), 8.44-8.45 (m, 2H, CH), 8.78 (br.s, 1H, NH), 9.34 (br.s, 1H, NH), 11.13 (br.s, 1H, NH), 12.23 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 16.0 (CH₃), 22.3 (CH₂), 22.4 (CH₃), 31.3, 31.4, 37.0 (CH₂), 52.1 (CH), 74.4 (C_q), 118.8, 127.6, 128.0, 128.1, 128.4, 129.2 (CH), 131.9, 132.1, 137.1, 137.2 (C_q), 137.3 (CH), 142.3, 143.2, 143.3 (C_q), 168.7, 168.8, 169.9, 170.9, 171.0 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3267 w, 1635 m, 1523 m, 1445 m, 1371 w, 1270 m, 1213 m, 1130 m, 1036 w, 907 w, 746 s, 699 s, 657 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1475.709—gemessen 1475.737 für C₈₇H₉₁N₁₄O₉⁺.

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **96** to compound **90**. Compound **96** is a complex molecule with a central benzene ring substituted with two 1-((2,2,2-trifluoroethyl)imino)ethyl groups (Trt), an ethyl group, and a 2-((2-((benzyloxycarbonylhydrazono)amino)acetyl)amino)ethyl group. It reacts with TFA and HCl in DCM and MeOH to form compound **90**, where the Trt groups are removed and replaced by 1-((2,2,2-trifluoroethyl)imino)ethyl groups, and the central benzene ring is substituted with two 1-((2,2,2-trifluoroethyl)imino)ethyl groups (Trt), an ethyl group, and a 2-((2-((benzyloxycarbonylhydrazono)amino)acetyl)amino)ethyl group.

C₄₉H₆₆Cl₂N₄O₉; 1066.043 g·mol⁻¹; **Smp** = 178 °C (Zersetzung); δ = 1.03 (t, ³J = 7.30 Hz, 9H, CH₃), 1.80 (s, 6H, CH₃), 2.38-2.42 (m, 2H, CH₂), 2.67 (br.s, 6H, CH₂), 2.88-3.09 (m, 4H, CH₂), 3.44 br.s, 2H, CH₂), 4.20-4.35 (m, 6H, CH₂), 4.60-4.65 (m, 2H, CH), 5.26 (s, 2H, CH₂), 6.82-6.84 (m, 1H, CH), 7.32-7.43 (m, 10H, CH), 7.90 (br.s, 3H, NH), 8.24-8.28 (m, 2H, NH), 8.58 (br.s, 1H, NH), 8.98 (s, 2H, CH), 9.41 (br.s, 1H, NH), 9.91 (br.s, 1H, NH), 12.30 (br.s, 1H,

NH), 14.21 (br.s, 3H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0 (CH₃), 22.4, 27.3, 33.7, 34.9, 35.1, 35.6, 37.3, 40.9 (CH₂), 51.6 (CH), 68.2 (CH₂), 112.7, 116.5 (CH), 125.4 (C_q), 128.3, 129.5 (CH), 131.5, 132.2 (C_q), 133.4 (CH), 134.9, 143.2, 143.4, 154.3, 158.5, 158.9, 169.3, 169.4, 169.8, 169.9 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3259 s, 3030 w, 1968 w, 1758 w, 1649 s, 1540 s, 1287 m, 1238 m, 1184 m, 764 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 991.490—gemessen 991.490 für C₄₉H₆₃N₁₄O₉⁺.

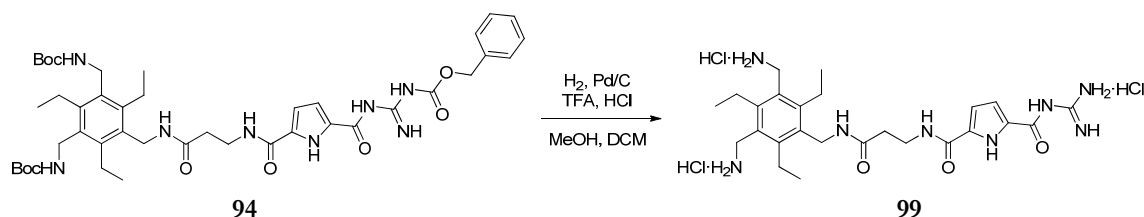
Synthese des Rezeptors **91**¹³⁶



Edukt **90** (50.0 mg, 0.051 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit 10 % Pd/C (5.40 mg, 0.051, 1.00 Äq.) in 10 ml Methanol suspendiert und unter Wasserstoffatmosphäre bei 40 °C für 3 h gerührt. Danach wurde der Katalysator durch Filtration abgetrennt und das erhaltene Filtrat destillativ unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 40 g, 298 nm, 30 ml min⁻¹, Gradient Methanol 25 % bis 35 % in 25 min, Produktpeak nach 25 min) gereinigt und anschließen zweimal mit 0.1 N Salzsäure lyophilisiert. Produkt **91** wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 93 % (64.0 mg, 0.047 mmol) erhalten.

C₄₁H₆₀Cl₃N₁₄O₇: 967.364 g·mol⁻¹; **Smp** = 180 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.03 (t, ³J = 6.60 Hz, 9H, CH₃), 1.81 (s, 6H, CH₃), 2.38-2.41 (m, 2H, CH₂), 2.60 (br.s, 6H, CH₂), 2.89-3.10 (m, 4H, CH₂), 3.43-3.47 (m, 2H, CH₂), 4.24-4.30 (m, 6H, CH₂), 4.62-4.64 (m, 2H, CH), 6.83-6.84 (m, 1H, CH), 7.33 (s, 2H, CH), 7.57 (s, 1H, CH), 7.93 (br.s, 3H, NH), 8.29-8.33 (m, 2H, NH), 8.55-8.70 (m, 5H, NH₂, NH), 9.00 (s, 5H, CH), 12.14 (br.s, 1H, NH), 12.34 (s, 1H, NH), 14.35, 14.56 (br.s, 4H, NH, NH⁺); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0, 22.5, (CH₃), 27.2, 34.9, 35.6, 37.2 (CH₂), 51.6 (CH), 112.6, 115.9, 116.5 (CH), 125.3, 129.5, 131.5, 132.1, 132.8 (C_q), 133.4 (CH), 143.2, 143.3 (C_q), 155.6, 159.0, 159.6, 169.3, 169.4, 169.8, 169.9 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3266 s, 2968 s, 1702 s, 1648 s, 1542 s, 1285 s, 1192 s, 826 w, 754 m, 626 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 857.453—gemessen 857.452 für C₄₁H₅₈N₁₄O₇⁺.

6.4.6 Synthese des Rezeptors 99

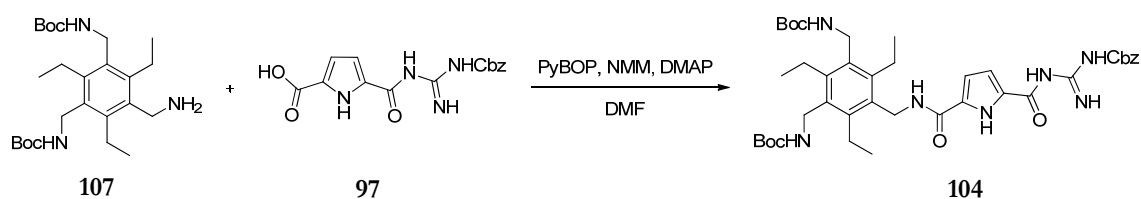


Edukt **94** (130 mg, 0.156 mmol, 1.00 Äq.) und Pd/C (16.6 mg, 0.156 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml Methanol gelöst und für 2 h bei 40 °C unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat wurde destillativ unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt mit 0.1 N Salzsäure lyophilisiert. Das Produkt **99** wurde in einer Ausbeute von 79 % (75.0 mg, 0.123 mmol) erhalten.

C₂₅H₄₁Cl₃N₈O₃: 608.004 g·mol⁻¹; **Smp** = 239 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.04-1.10 (m, 9H, CH₃), 2.40 (t, ³J = 6.90 Hz, 2H, CH₂), 2.69-2.71 (m, 6H, CH₂), 3.45 (q, ³J = 6.30 Hz, 2H, CH₂), 4.00-4.01 (m, 4H, CH₂), 4.32-4.33 (m, 2H, CH₂), 6.84-6.85 (m, 1H, CH), 7.59-7.60 (m, 1H, CH), 7.98 (br.s, 1H, NH), 8.44-8.73 (m, 11H, NH₂, NH, NH₃⁺), 12.16 (br.s, 1H, NH), 12.36 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ = 15.8, 15.9 (CH₃), 22.9, 23.2, 34.9, 35.6, 36.0, 37.0 (CH₂), 112.7, 116.0, 125.3 (CH), 128.7, 132.9, 144.1, 145.1 (C_q), 155.6, 159.0, 159.7, 170.0 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3325 s, 2968 s, 2631 w, 1699 s, 1643 m, 1556 s, 1285 m, 1194 s, 1056 s, 755 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 499.314—gemessen 499.314 für C₂₅H₃₉N₈O₃⁺.

6.4.7 Synthese des Rezeptors 100

Synthese der Verbindung 104

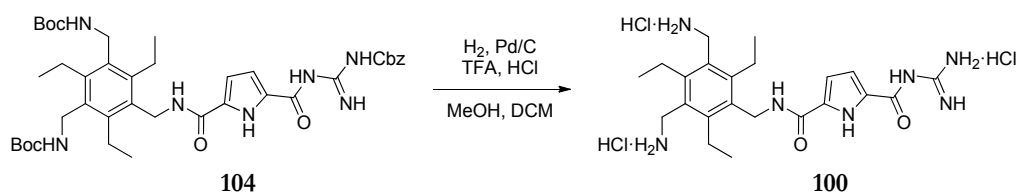


Edukt **97**¹⁵⁸ (73.5 mg, 0.222 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit PyBOP (127 mg, 0.245 mmol, 1.10 Äq.) und NMM (0.5 ml, 4.55 mmol, 20.5 Äq.) in 2 ml Dimethylformamid gelöst und für 5 min gerührt. Templat **107** (100 mg, 0.222 mmol, 1.00 Äq.) und DMAP (5.43 mg, 0.044 mmol, 0.20 Äq.) wurden gelöst in 1 ml Dichlormethan zur Reaktionslösung

gegeben und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum konzentriert und das erhaltene gelbe Öl wurde chromatographisch (MPLC, RP18, 40 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 290 nm, 40 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 70 % bis 100 % in 35 min, Produktpeak in 15 min) gereinigt. Das Produkt **104** wurde in einer Ausbeute von 58 % (99.0 mg, 0.130 mmol) erhalten.

C₄₀H₅₅N₇O₈: 761.907 g·mol⁻¹; **Smp** = 188 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.08 (t, ³J = 6.60 Hz, 9H, CH₃), 1.38 (s, 18H, CH₃), 2.69-2.71 (m, 6H, CH₂), 4.21-4.22 (m, 4H, CH₂), 4.45-4.46 (m, 2H, CH₂), 5.13 (s, 2H, CH₂), 6.59 (s, 2H, CH₂), 6.82-6.83 (m, 1H, CH), 7.38-7.39 (m, 5H, CH), 8.29 (s, 1H, CH), 8.77 (br.s, 1H, NH), 9.33 (br.s, 1H, NH), 11.20 (br.s, 1H, NH), 12.32 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.1, 16.2, 22.5, 28.2 (CH₃), 37.4, 38.1, 66.1 (CH₂), 77.7 (C_q), 112.9, 114.5 (CH), 127.6, 127.8, 128.4 (CH), 131.4, 132.4, 136.4, 143.0 (C_q), 155.2, 158.9, 159.7 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3392 s, 2973 s, 2931 m, 2873 w, 1698 s, 1635 m, 1540 s, 1366 m, 1279 s, 1215 s, 1163 m, 1045 m, 756 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 762.418—gemessen 762.418 für C₄₀H₅₆N₇O₈⁺.

Synthese des Rezeptors **100**



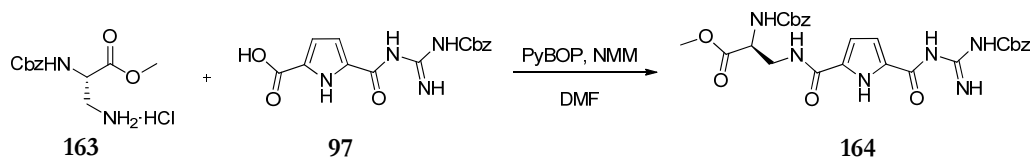
Edukt **104** (82.0 mg, 0.108 mmol, 1.00 Äq.) und Pd/C (11.5 mg, 0.108 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Stickstoffatmosphäre in 20 ml Methanol suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde unter Wasserstoffatmosphäre für 2 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat destillativ unter vermindertem Druck vom Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit Trifluoressigsäure (1.00 ml, 13.0 mmol, 120 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösemittels wurde der erhaltene Feststoff mit 0.1 N Salzsäure lyophilisiert. Produkt **100** wurde in einer Ausbeute von 99 % (57.0 mg, 0.106 mmol) erhalten.

C₂₂H₃₈Cl₂N₇O₂: 538.942 g·mol⁻¹; **Smp** = 243 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.08-1.14 (m, 9H, CH₃), 2.80-2.82 (m, 6H, CH₂), 4.03-4.04 (m, 4H, CH₂), 4.52-4.53 (m, 2H, CH₂), 6.93-6.95 (m, 1H, CH), 7.59-7.60 (m, 1H, CH), 8.45-8.72 (m, 11H, NH₂, NH, NH₃⁺), 12.17 (br.s, 1H, NH), 12.48 (s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.9, 23.0, 23.3 (CH₃), 36.0, 37.2 (CH₂), 113.6, 115.8 (CH), 125.6, 128.8, 132.4, 144.4, 145.3

(C_q), 155.6, 158.6, 159.7 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3361 s, 2969 s, 2626 w, 1699 s, 1628 m, 1556 s, 1470 m, 1273 s, 1193 m, 1047 s, 755 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 540.259—gemessen 540.266 für C₂₂H₃₆N₇O₂ + Na⁺.

6.4.8 Synthese der Rezeptoren 101 und 102

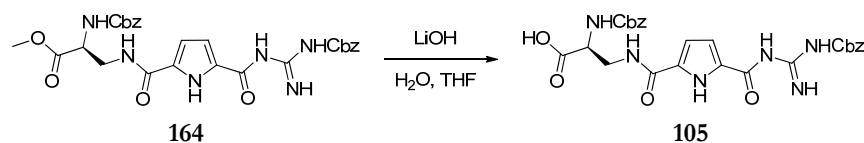
Synthese der Verbindung 164¹³¹



Edukt **97**¹⁵⁸ (270 mg, 0.817 mmol, 1.00 Äq.) und PyBOP (425 mg, 0.817 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 10 ml Dimethylformamid und NMM (1.50 ml, 13.6 mmol, 16.6 Äq.) gelöst. Nach Zugabe von Edukt **163** (260 mg, 0.899 mmol, 1.10 Äq.) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 50 ml eisgekühltes Wasser zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat dreimal mit 20 ml Diethylether gewaschen und der erhaltene Feststoff mit der vom Lösemittel befreiten Etherfraktion vereinigt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (SiO₂, Essigester/Cyclohexan 7/3) gereinigt. Produkt **164** wurde als hell orangener Feststoff in einer Ausbeute von 63 % (290 mg, 0.514 mmol) erhalten.

C₂₇H₂₈N₆O₈: 564.547 g·mol⁻¹; **Smp** = 101 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 3.52-3.59 (m, 2H, CH₂), 3.62 (s, 3H, CH₃), 4.27-4.32 (m, 1H, CH), 5.04 (d, ³J = 2.80 Hz, 2H, CH₂), 5.14 (s, 2H, CH₂), 6.78 (d, ³J = 3.40 Hz, 1H, CH), 6.96 (s, 1H, CH), 7.30-7.39 (m, 10H, CH), 7.73 (d, ³J = 8.00 Hz, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, NH), 8.77 (br.s, 1H, NH), 9.36 (br.s, 1H, NH), 11.12 (br.s, 1H, NH), 11.85 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 52.1 (CH₃), 53.7 (CH), 65.7, 66.2 (CH₂), 112.0, 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 128.4, 128.7 (CH), 136.7, 155.9, 160.0, 171.0 (C_q); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3385 m, 2953 m, 2362 w, 1735 s, 1636 s, 1551 s, 1282 s, 1213 s, 1048 m, 752 w, 697 w, 578 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 587.186—gemessen 587.186 für C₂₇H₂₈N₆O₈ + Na⁺.

Synthese der Verbindung 105¹³¹



Eine Mischung aus Edukt **164** (270 mg, 0.478 mmol, 1.00 Äq.) und Lithiumhydroxid (22.9 mg, 0.957 mmol, 2.00 Äq.) in 8 ml Tetrahydrofuran und 2 ml Wasser wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt, das erhaltene Öl in 20 ml Wasser gelöst, mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und mit kleinen Mengen Diethylether gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde über Orangegel im Vakuum getrocknet. Produkt **105** wurde in einer Ausbeute von 84 % (220 mg, 0.400 mmol) erhalten.

C₂₆H₂₆N₆O₈: 550.520 g·mol⁻¹; **Smp** > 215 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 3.48-3.68 (m, 2H, CH₂), 4.23-4.24 (m, 1H, CH), 5.03 (d, ³J = 1.10 Hz, 2H, CH₂), 5.14 (s, 2H, CH₂), 6.78 (m, 1H, CH), 6.97 (s, 1H, CH), 7.30-7.39 (m, 10H, CH), 7.58 (d, ³J = 8.10 Hz, 1H, NH), 8.49 (t, ³J = 5.50 Hz, 1H, NH), 8.77 (br.s, 1H, NH), 9.36 (br.s, 1H, NH), 11.85 (br.s, 2H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 40.0 (CH₂), 53.9 (CH), 65.5, 66.2 (CH₂), 112.1, 114.7 (CH), 127.0 (C_q), 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.3, 128.4 (CH), 130.0, 136.6, 136.9 (C_q), 156.0, 158.9, 160.0, 171.9 (CO, CN); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3347 s, 2926 w, 1688 s, 1560 s, 1409 w, 1290 s, 1045 w, 808 w, 750 m, 579 w; **HR-MS** (neg. ESI) m/z = berechnet 549.173—gemessen 549.173 für C₂₆H₂₅N₆O₈⁻.

Synthese der Verbindung 165¹³¹

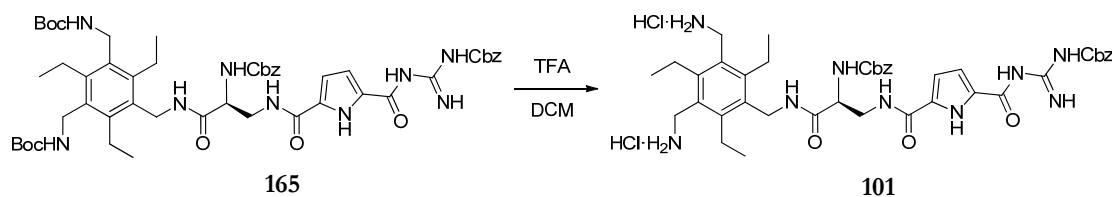


Edukt **105** (170 mg, 0.309 mmol 1.50 Äq.), PyBOP (161 mg, 0.309 mmol, 1.50 Äq.) und DMAP (37.7 mg, 0.309 mmol, 1.50 Äq.) wurden in 2 ml DMF gelöst anschließend wurden Edukt **92** (93.0 mg, 0.206 mmol, 1.00 Äq.) und NMM (1.00 ml, 9.00 mmol, 44.0 Äq.) gelöst in 8 ml Dichlormethan zur Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und das Rohprodukt chromatographisch (MPLC, SiO₂, 12 g, 50 µm, 290 nm, 20 ml·min⁻¹,

isokratisch Cyclohexan/Essigester 1/1) gereinigt. Produkt **165** wurde in einer Ausbeute von 60 % (120 mg, 0.122 mmol) erhalten.

C₅₁H₆₇N₉O₁₁: 982.131 g·mol⁻¹; **Smp** = 169 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.01-1.07 (m, 9H, CH₃), 1.38 (s, 18H, CH₃), 2.58-2.71 (m, 6H, CH₂), 3.50-3.51 (m, 2H, CH₂), 4.17-4.31 (m, 7H, CH, CH₂), 5.00 (s, 2H, CH₂), 5.14 (s, 2H, CH₂), 6.51 (s, 2H, NH), 6.77 (s, 1H, CH), 7.31-7.40 (m, 11H, CH), 7.77 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, NH), 8.80 (br.s, 1H, NH), 9.35 (br.s, 1H, NH), 11.15 (br.s, 1H, NH), 12.26 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.0, 16.2 (CH₃), 22.5 (CH₂), 28.2 (CH₃), 37.4, 38.1 (CH₂), 54.7 (CH), 65.5 (CH₂), 77.7 (C_q), 112.2, 115.2, 127.6, 127.7, 128.3, 128.4 (CH), 131.3, 132.3, 136.8, 142.8, 143.3 (C_q), 155.2, 155.6, 159.8, 169.5 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3392 m, 2974 m, 1685 s, 1527 s, 1366 m, 1267 s, 1166 s, 1046 w, 698 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 1004.485—gemessen 1004.485 für C₅₁H₆₇N₉O₁₁ + Na⁺.

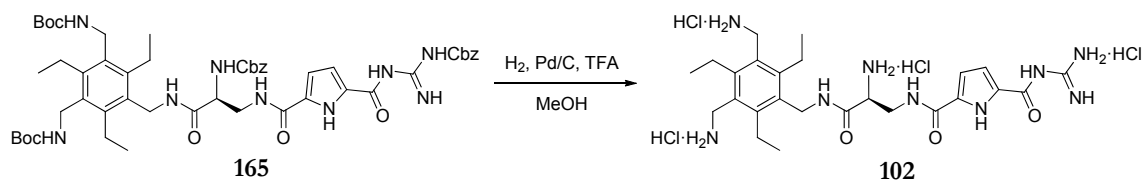
Synthese des Rezeptors **101**



Edukt **165** (50.0 mg, 0.051 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 1 ml Dichlormethan suspendiert und anschließend Trifluoressigsäure (1.00 ml, 13.0 mmol, 255 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 1 h gerührt und danach das Lösemittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 5 %iger Salzsäure gelöst und lyophilisiert. Produkt **101** wurde in einer Ausbeute von 100 % (45.0 mg, 0.053 mmol) erhalten.

C₄₁H₅₃Cl₂N₉O₇: 854.822 g·mol⁻¹; **Smp** > 250 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.03-1.10 (m, 9H, CH₃), 2.40 (t, ³J = 6.90 Hz, 2H, CH₂), 2.69-2.71 (m, 6H, CH₂), 3.45 (q, ³J = 6.30 Hz, 2H, CH₂), 4.00-4.01 (m, 4H, CH₂), 4.32-4.33 (m, 2H, CH₂), 6.84-6.85 (m, 1H, CH), 7.59-7.60 (m, 1H, CH), 7.98 (br.s, 1H, NH), 8.44-8.73 (m, 11H, NH₂, NH, NH₃⁺), 12.16 (br.s, 1H, NH), 12.36 (br.s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.8, 15.9 (CH₃), 22.9, 23.2, 34.9, 35.6, 36.0, 37.0 (CH₂), 112.7, 116.0, 125.3 (CH), 128.7, 132.9, 144.1, 145.1 (C_q), 155.6, 159.0, 159.7, 170.0 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3325 s, 2968 s, 2631 w, 1699 s, 1643 m, 1556 s, 1285 m, 1194 s, 1056 s, 755 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 499.314—gemessen 499.314 für C₂₅H₃₉N₈O₃⁺.

Synthese des Rezeptors 102

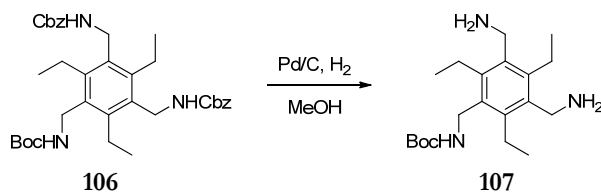


Edukt **165** (65.0 mg, 0.066 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 20 ml Methanol gelöst und unter Argonatmosphäre mit Pd/C (14.1 mg, 0.132 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Wasserstoffatmosphäre für 3 h bei 40 °C gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert, das Filtrat destillativ vom Lösemittel befreit und das erhaltene Produkt mit 0.1 N Salzsäure lyophilisiert. Produkt **102** wurde in einer Ausbeute von 100 % (44.0 mg, 0.067 mmol) erhalten.

C₂₅H₄₄Cl₄N₉O₃: 660.487 g·mol⁻¹; **Smp** > 250 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.04-1.11 (m, 9H, CH₃), 2.71-2.80 (m, 6H, CH₂), 3.66-3.68 (m, 2H, CH₂), 4.01 (br.s, 5H, CH₂, CH), 4.29-4.40 (m, 2H, CH₂), 6.95-6.97 (m, 1H, CH), 7.61-7.62 (m, 1H, CH), 8.44-8.74 (m, 14H, NH₂, NH, NH₃⁺), 8.93-8.96 (m, 1H, NH), 12.22 (br.s, 1H, NH), 12.38 (s, 1H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.8, 23.0 (CH₃), 36.0 (CH₂), 51.8, 113.3, 115.9 (CH), 125.6, 128.7, 131.7, 132.1, 144.5, 145.2 (C_q), 155.6, 159.6, 159.8, 166.3 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3381 s, 2970 s, 1702 s, 1698 s, 1556 s, 1286 s, 1287 m, 1200 s, 758 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 514.325—gemessen 514.325 für C₂₅H₄₁N₉O₃⁺.

6.4.9 Synthese des Rezeptors 103

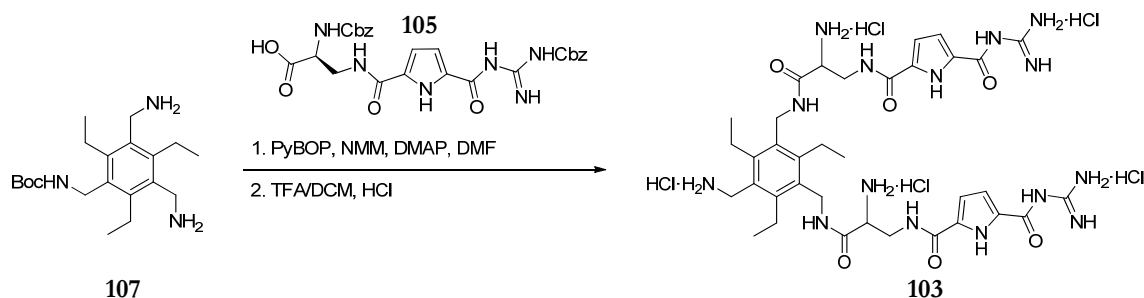
Synthese der Verbindung 107



Templat **106** (1.60 g, 2.59 mmol, 1.00 Äq.) und Pd/C (276 mg, 2.59 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in 150 ml Methanol suspendiert und anschließend unter Wasserstoffatmosphäre für 2 h bei 40 °C gerührt. Um den Katalysator zu entfernen wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und danach das Lösemittel des Filtrats destillativ unter vermindertem Druck entfernt. Produkt **107** wurde in einer Ausbeute von 100 % (910 mg, 2.60 mmol) erhalten.

C₂₀H₃₅N₃O₂: 349.511 g·mol⁻¹; **Smp** > 105 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.08-1.14 (m, 9H, CH₃), 1.38 (s, 9H, CH₃), 2.67-2.79 (m, 6H, CH₂), 3.69 (s, 4H, CH₂), 4.16 (d, ³J = 4.60 Hz, 4H, CH₂), 6.72 (br.s, 4H, CH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 16.5, 16.8, (CH₃), 21.8, 22.5 (CH₂), 28.3 (CH₃), 38.2, 39.1 (CH₂), 77.5 131.8, 140.1 (C_q), 155.3 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3344 br.s, 2969 m, 1704 s, 1500 m, 1365 m, 1170 s, 1045 w, 868 w, 772 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 372.262—gemessen 372.262 für C₂₀H₃₅N₃O₂ Na⁺.

Synthese des Rezeptors 103



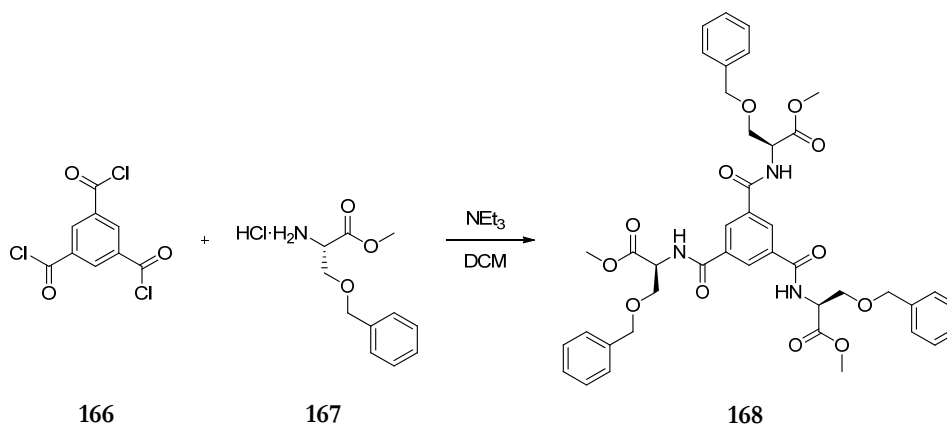
Templat **107** (252 mg, 0.458 mmol, 2.00 Äq.), PyBOP (238 mg, 0.458 mmol, 2.00 Äq.), DMAP (5.59 mg, 0.046 mmol, 0.20 Äq.) und NMM (1.00 ml, 9.00 mmol, 40.0 Äq.) wurden in 15 ml Dimethylformamid gelöst, für 5 min gerührt und danach mit Edukt **105**¹³¹ (80.0 mg, 0.229 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 ml Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und chromatographisch (MPLC, RP18, 40 g, 50 µm, 25 x 2.5 cm, 290 nm, 40 ml·min⁻¹, Gradient Methanol 40 % bis 100 % in 25 min) gereinigt. Das Zwischenprodukt wurde mit Pd/C (48.7 mg, 0.458 mmol, 2.00 Äq.) in Methanol umgesetzt und für 3 h bei 40 °C gerührt. Nach Filtration des Katalysators über einen Membranfilter (Nylon, 0.45 µm) und destillativer Entfernung des Lösemittels wurde das resultierende Öl in 2 ml Dichlormethan/Trifluoressigsäure (1/1) gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel destillativ unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff zweimal mit 0.1 N Salzsäure lyophilisiert. Produkt **103** wurde in einer Ausbeute von 14 % (30.0 mg, 0.031 mmol) erhalten.

C₃₅H₅₉Cl₅N₁₅O₆: 963.205 g·mol⁻¹; **Smp** = 245 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.08 (t, ³J = 7.30 Hz, 9H, CH₃), 2.66-2.70 (m, 6H, CH₂), 3.65 (m, 2H, CH₂), 4.01 (br.s, 4H, CH₂, CH), 4.29-4.38 (m, 4H, CH₂), 6.95 (d, ³J = 1.82 Hz, 2H, CH), 7.55 (br.s, 2H, CH), 8.31-8.84 (m, 20H, NH₂, NH, NH₃⁺), 12.08 (br.s, 2H, NH), 12.37 (s, 2H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 15.9, 16.0, 22.9 (CH₃), 37.6 (CH₂), 51.8, 113.2, 115.9 (CH), 125.6, 128.4, 131.4, 132.2, 144.0 (C_q), 155.5, 159.6, 159.8, 166.3 (CN, CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] =

3396 s, 1699 s, 1559 s, 1476 w, 1284 s, 1200 w, 756 w; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 800.403—gemessen 800.406 für $C_{35}H_{51}N_{15}O_6 + Na^+$.

6.4.10 Synthesen von Vorstufen potentieller Deckel für einen käfigartigen Rezeptor

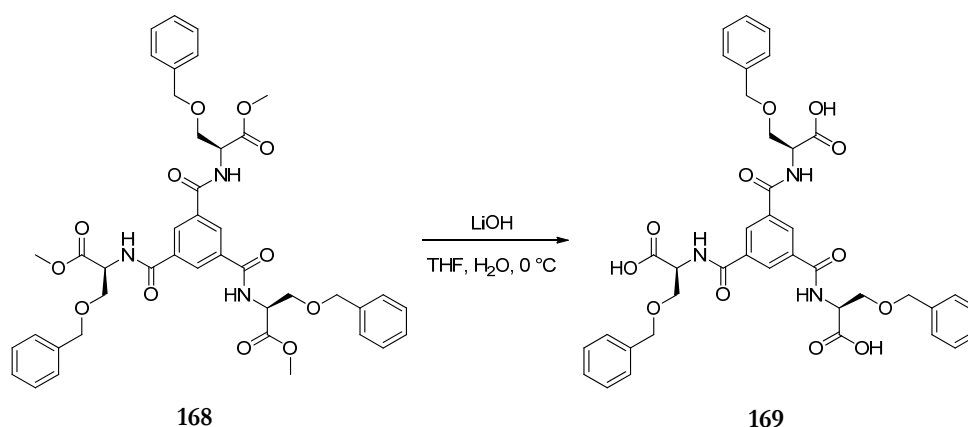
Synthese der Verbindung 168



Trimesinsäurechlorid **166** (739 mg, 2.38 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst und vorsichtig zu einer Suspension aus H-Ser(Bzl)-OMe·HCl **167** (2.36 g, 11.4 mmol, 4.00 Äq.) und Triethylamin (3.09 ml, 22.3 mmol, 8.00 Äq.) in ebenfalls 10 ml trockenem Dichlormethan getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und am nächsten Tag mit 34 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 30 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel destillativ entfernt. Das erhaltene ölige Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, SiO_2 , 50 μm , 50 x 2.5 cm, 220 nm, 80 ml·min⁻¹, isokratisch Cyclohexan/Dichlormethan/Methanol 6/3/1) gereinigt. Das Produkt **168** wurde in einer Ausbeute von 77 % (1.65 g, 2.10 mmol) erhalten.

C₄₂H₄₅N₃O₁₂: 783.820 g·mol⁻¹; **Smp** = 78-95 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.67 (s, 9H, CH₃), 3.81-3.89 (m, 6H, CH₂), 4.55 (dd, ²*J* = 17.2 Hz, ⁴*J* = 12.2 Hz, 6H, CH₂), 4.80-4.84 (s, 3H, CH), 7.25-7.35 (m, 15H, CH), 8.51 (s, 3H, CH), 9.17 (d, ³*J* = 7.42 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 52.1 (CH₃), 53.1 (CH), 68.6, 72.0 (CH₂), 127.5, 127.5, 128.3, 129.6 (CH), 134.1, 137.9 (C_q), 165.7, 170.4 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3234 w, 3063 w, 2357 w, 1748 s, 1635 s, 1538 s, 1453 m, 1304 m, 1203 s, 1104 s, 907 w, 736 s, 696 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 806.290—gemessen 806.299 für $C_{42}H_{45}N_3O_{12} + Na^+$.

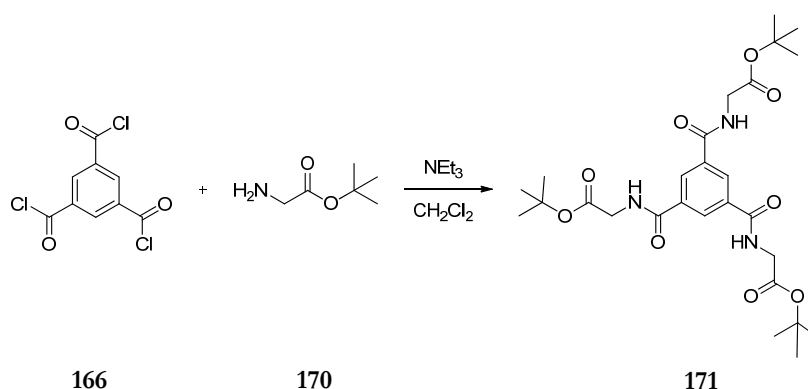
Synthese der Verbindung 169



Edukt **168** (1.50 g, 1.91 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 7.5 ml Tetrahydrofuran gelöst und die Lösung im Eisbad gekühlt. Zur gekühlten Lösung wurde Lithiumhydroxid (583 mg, 24.4 mmol, 13.0 Äq.) gelöst in 7.5 ml Wasser gegeben und anschließend über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde nochmals Lithiumhydroxid (292 mg, 12.2 mmol, 6.40 Äq.) zur Reaktionslösung gegeben. Nach einer weiteren Nacht Rühren bei Raumtemperatur wurde wieder Lithiumhydroxid (580 mg, 24.2 mmol, 12.7 Äq.) zugegeben und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag zeigte die Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie eine vollständige Umsetzung des Edukts an. Die Reaktionslösung wurde mit 5 %iger Salzsäure auf pH 1 angesäuert, der entstandene Niederschlag abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und über Orangegel im Exsikkator getrocknet. Das Produkt **169** konnte in einer Ausbeute von 89 % (1.26 g, 1.70 mmol) erhalten werden.

C₃₉H₃₉N₃O₁₂: 741.740 g·mol⁻¹; **Smp** = 236-239 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 3.82 (dd, ²J = 9.88 Hz, ³J = 4.32 Hz, 3H, CH₂), 3.88 (dd, ²J = 9.81 Hz, ³J = 7.04 Hz, 3H, CH₂), 4.55 (dd, ²J = 14.5 Hz, ⁴J = 12.2 Hz, 6H, CH₂), 4.75-4.79 (s, 3H, CH), 7.24-7.35 (m, 15H, CH), 8.49 (s, 3H, CH), 9.00 (d, ³J = 7.67 Hz, 3H, NH), 12.92 (s, 3H, OH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 53.1 (CH), 68.9, 72.0 (CH₂), 127.5, 127.6, 128.2, 129.4 (CH), 134.3, 138.0 (C_q), 165.7, 171.4 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 1739 s, 1644 m, 1559 m, 1312 m, 1206 m, 1064 m, 862 w, 744 m, 698 m, 670 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 764.243—gemessen 764.248 für C₃₉H₃₉N₃O₁₂ + Na⁺.

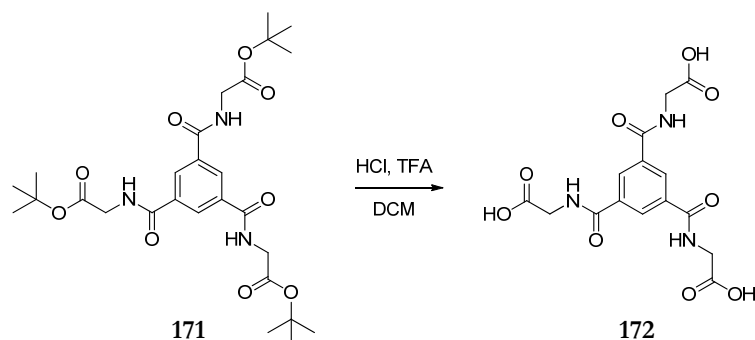
Synthese der Verbindung 171



H-Gly-O*t*Bu **170** (593 mg, 4.52 mmol, 4.00 Äq.) wurde in 6 ml Dichlormethan gelöst, mit Triethylamin (1.25 ml, 9.04 mmol, 8.00 Äq.) versetzt und die Reaktionslösung im Eisbad gekühlt. Zur gekühlten Reaktionslösung wurde Trimesinsäurechlorid **166** (300 mg, 1.13 mmol, 1.00 Äq.) gelöst in 6 ml trockenem Dichlormethan zugetropft und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 10 ml Wasser zur Reaktion gegeben und die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit NaHCO₃-Lösung und 5 %iger Salzsäure gewaschen und dann das Lösemittel destillativ entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (MPLC, SiO₂, 50 µm, 50 x 2.5 cm, 220 nm, 20 ml·min⁻¹, isokratisch Dichlormethan/Methanol 9.5/0.5) gereinigt. Produkt **171** wurde in einer Ausbeute von 73 % (456 mg, 0.830 mmol) erhalten.

C₂₇H₃₉N₃O₉: 549.613 g·mol⁻¹; **Smp** = 185 °C; **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.43 (s, 27H, CH₃), 3.94 (d, ³J = 5.92 Hz, 6H, CH₂), 8.49 (s, 3H, CH), 9.10 (t, ³J = 5.77 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 27.7 (CH₃), 42.0 (CH₂), 80.7 (C_q), 128.9 (CH), 134.5 (C_q), 165.7, 168.8 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3394 w, 3286 w, 2978 w, 2938 w, 1744 m, 1729 m, 1669 m, 1644 m, 1533 s, 1365 m, 1240 m, 1221 m, 1150 s, 845 w, 749 m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 572.276—gemessen 572.282 für C₂₇H₃₉N₃O₉ + Na⁺.

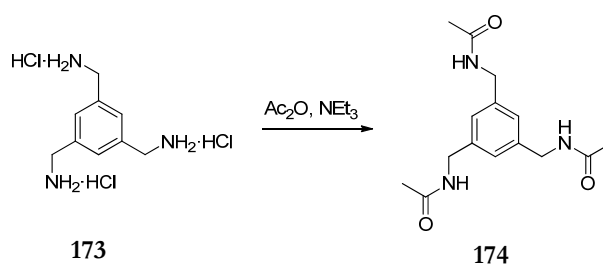
Synthese der Verbindung 172



Edukt **171** (450 mg, 0.819 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 4.5 ml Dichlormethan gelöst und mit konzentrierter Salzsäure (126 µl, 4.09 mmol, 5.00 Äq.) und Trifluoressigsäure (3.15 ml, 40.9 mmol, 50.0 Äq.) versetzt. Die Umsetzung des Edukts **171** wurde mittels HPLC-Kontrolle (YMC-Pack ODS-A, 150 x 3.00 mm i. d., 5 µm, 12 nm, 0.43 ml min⁻¹, Gradient 70 % bis 100 % Methanol mit 0.05 % TFA-Zusatz in 8.00 min, Produktpeak nach 1.88 min) verfolgt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung destillativ vom Lösemittel befreit und anschließend lyophilisiert. Produkt **172** wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 90 % (281 mg, 0.737 mmol) erhalten.

C₁₅H₁₅N₃O₉: 381.294 g·mol⁻¹; **Smp** > 255 °C (Zersetzung); **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO_{d6}) δ = 3.97 (d, ³J = 5.79 Hz, 6H, CH₂), 8.49 (s, 3H, CH), 9.09 (t, ³J = 5.79 Hz, 3H, NH), 12.65 (br.s, 3H, OH); **¹³C-NMR** (125.8 MHz, DMSO_{d6}) δ = 41.3 (CH₂), 128.9 (CH), 134.5, (C_q), 165.7, 171.1 (CO); **FT-IR** (ATR) [cm⁻¹] = 3353 w, 1718 m, 1646 s, 1542 s, 1415 m, 1359 w, 1309 w, 1245 s, 1030 w, 925 w, 673m; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 380.074—gemessen 380.076 für C₁₅H₁₄N₃O₉⁺.

Synthese eines möglichen Templats 174 für die templatbasierte Cyclisierung



Edukt **173** (50.0 mg, 0.182 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2.00 ml Essigsäureanhydrid suspendiert, mit Triethylamin (202 µl, 1.46 mmol, 8.00 Äq.) versetzt und anschließend über Nacht auf 60 °C

erhitzt. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie die vollständige Umsetzung des Edukts **173** nachgewiesen worden war, wurde die klare gelbe Lösung am Rotationsverdampfer destillativ vom Lösemittel befreit und der erhaltene Rückstand chromatographisch (Dichlormethan/Methanol 9/1 Zusatz von 0.1 % TFA) gereinigt. Das Produkt **174** wurde einer Ausbeute von 35 % (18.0 mg, 0.064 mmol) erhalten.

C₁₅H₂₁N₃O₃: 291.346 g·mol⁻¹; **Smp** = 219.7 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO_{d6}) δ = 1.86 (s, 9H, CH₃), 4.19 (d, ³J = 6.80 Hz, 6H, CH₃), 6.99 (s, 3H, CH), 8.32 (t, ³J = 5.75 Hz, 3H, NH); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO_{d6}) δ = 22.6 (CH₃), 42.0 (CH₂), 124.7(CH), 139.7 (C_q), 169.0 (CO); **FT-IR** (KBr) [cm⁻¹] = 3288 m, 1627 s, 1537 s, 1435 m, 1373 m, 1280 m, 1237 m, 1093 w, 1034 m, 874 m, 603 s; **HR-MS** (pos. ESI) m/z = berechnet 314.148—gemessen 314.152 für C₁₅H₂₁N₃O₃ + Na⁺.

6.5 Bindungsstudien

6.5.1 Pufferlösungen

Die Lösungen des Natriumcacodylat-Puffers (50 mM) mit pH 7 und pH 5 wurden aus drei Stammlösungen – einer 0.1 M, einer 1.0 M Salzsäurelösung sowie einer Natriumcacodylat-trihydrat-Lösung (0.2 M, 8.56 g in 200 ml Wasser; $214.03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) – hergestellt.

V (HCl, 0.1 M) [ml]	pH	V (HCl, 1.0 M) [ml]	pH
6.75	7.4	7.40	6.0
10.50	7.2	8.70	5.8
15.75	7.0	9.80	5.6
23.25	6.8	10.75	5.4
33.25	6.6	11.25	5.2
45.75	6.4	11.75	5.0
58.25	6.2		

Tabelle 6-1: Benötigte Mengen an Salzsäure (0.1 M und 1.0 M) zur Herstellung von 250 ml Natriumcacodylat-Puffer aus 62.5 ml Natriumcacodylat-Stammlösung (0.2 M).¹⁷⁹

Für 250 ml Puffer (pH 7, 50 mM) wurden nach den Werten in Tabelle 6-1 62.5 ml Natriumcacodylat-Stammlösung (0.2 M) mit 15.75 ml Salzsäurelösung (0.1 M) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 250 ml aufgefüllt. Entsprechend wurde für 250 ml Pufferlösung mit pH 5 (50 mM) 62.5 ml Natriumcacodylat-Stammlösung (0.2 M) mit 11.75 ml Salzsäurelösung (1.0 M) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 250 ml verdünnt.

6.5.2 Polynukleotidlösungen

6.5.2.1 Präparation der ctDNA

Die käuflich erwerbliche ctDNA (10 mg) wurde mittels einer Kunststoffpinzette in einen Falcon überführt und in 1 ml Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, 0.01 M) gelöst und über Nacht im Kühlschrank verwahrt. Zur homogenen Fragmentierung der DNA-Stränge wurde die ctDNA-Lösung mit Hilfe einer Ultraschallsonde 8-mal je 4 Sekunden behandelt. Da sich die Lösung während der Behandlung erwärmt wurde die Lösung zwischen jeder Behandlung im Eisbad gekühlt und anschließend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Abschließend wurde die ctDNA-Lösung über eine PE-Spritzenfilter ($450 \mu\text{m}$) filtriert und die Konzentration der ctDNA-Stammlösung mittels UV-Spektroskopie bestimmt (s. Kapitel 6.5.2.2)

6.5.2.2 Präparation der künstlichen Polynukleotide

Zum Lösen der bei *Sigma-Aldrich* käuflich erworbenen künstlichen Polynukleotide mit definierter Sequenz wurden je 2-5 mg bzw. 2.5-10 UN des Polynukleotids in 200-250 μl Natriumcacodylat-Puffer (pH 7, 0.01 M) gelöst und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die Lösung in ein Eppendorf-Tube überführt und das Originalgefäß mit etwa 25 μl nachgewaschen. Die Konzentration der Lösung wurde mittels UV-Spektroskopie als Konzentration der Phosphate mit Hilfe der in Tabelle 6-3 aufgelisteten Epsilonwerte bestimmt. Es wurde je 5-mal 1 μl der PN-Lösung in 1 ml Cacodylat-Puffer (pH 7, 0.05 M) gegeben und die resultierende UV-Absorption gemessen.

Nukleinsäure	p dA \times p dT	p(dAdT) ₂	p dG \times p dC	p(dGdC) ₂	pA \times pU	pG \times pC	ctDNA
ϵ [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	6000	6600	7400	8400	6000	7400	6600
λ_{max} [nm]	260	262	253	254	260	253	260

Tabelle 6-2: Molare Extinktionskoeffizienten ϵ am UV-Absorptionsmaximum (λ_{max}) der verschiedenen Nukleinsäuren.^{160,161}

6.5.3 Allgemeine Vorgehensweise zur Durchführung der Fluoreszenztitrationen

Für alle vermessenen Substrate wurde die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise zur Durchführung der Fluoreszenztitrationen angewendet. Der jeweilige Rezeptor ($2 \cdot 10^{-5}$ - $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Cacodylatpuffer (pH 7, 0.05 M) wurde in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und schrittweise mit Substratlösung ($1.15 \cdot 10^{-3}$ - $2.3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt. Nach jeder Substratzugabe wurde nach 3 min Wartezeit nach einer Anregungswellenlänge von 220 nm das Emissionsspektrum im Bereich von 220-400 nm gemessen. Tabelle 6-3 beschreibt beispielhaft den Ablauf einer solchen Titration.

Durch Auftragung des Verhältnisses $V_{\text{S}}/V_{\text{R}}$ gegen die gemessene Intensität erhält man die Bindungsisotherme, aus der sich mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Software *Origin* die Bindungskonstante bestimmen lässt.

Nr.	V _s -Zugabe [μl]	V _{ges} [ml]	Verhältnis V _s /V _R	I _{beo.} bei λ _{max}	I durch Verdünnung
1	0	0.8000	0.0000	318.75735	318.75735
2	3.5	0.8035	0.0044	312.62979	317.36886
3	3.5	0.8070	0.0088	298.37775	315.99242

10	7	0.8350	0.0438	260.87228	305.39626
11	7	0.8420	0.0525	248.80919	302.85734
12	7	0.8490	0.0613	236.48145	300.36028
13	14	0.8630	0.0788	218.96587	295.48769
14	14	0.8770	0.0963	212.66899	290.77067
15	14	0.8910	0.1138	195.38004	286.20189
16	28	0.9190	0.1488	172.97017	277.48192
17	28	0.9470	0.1838	162.93719	269.27759
18	56	1.0030	0.2538	136.09505	254.24315
19	56	1.0590	0.3238	114.10959	240.79875
20	112	1.1710	0.4638	82.34678	217.76762

23	112	1.5070	0.8838	52.18808	169.21425

Tabelle 6-3: Beispiel für die Durchführung einer Fluoreszenztitration des Rezeptors **71**.

7. ANHANG

7.1 Messdaten

7.1.1 Stabilitätsmessung der Rezeptoren 71-73, 75, 86, 87, 89-91, 99-103

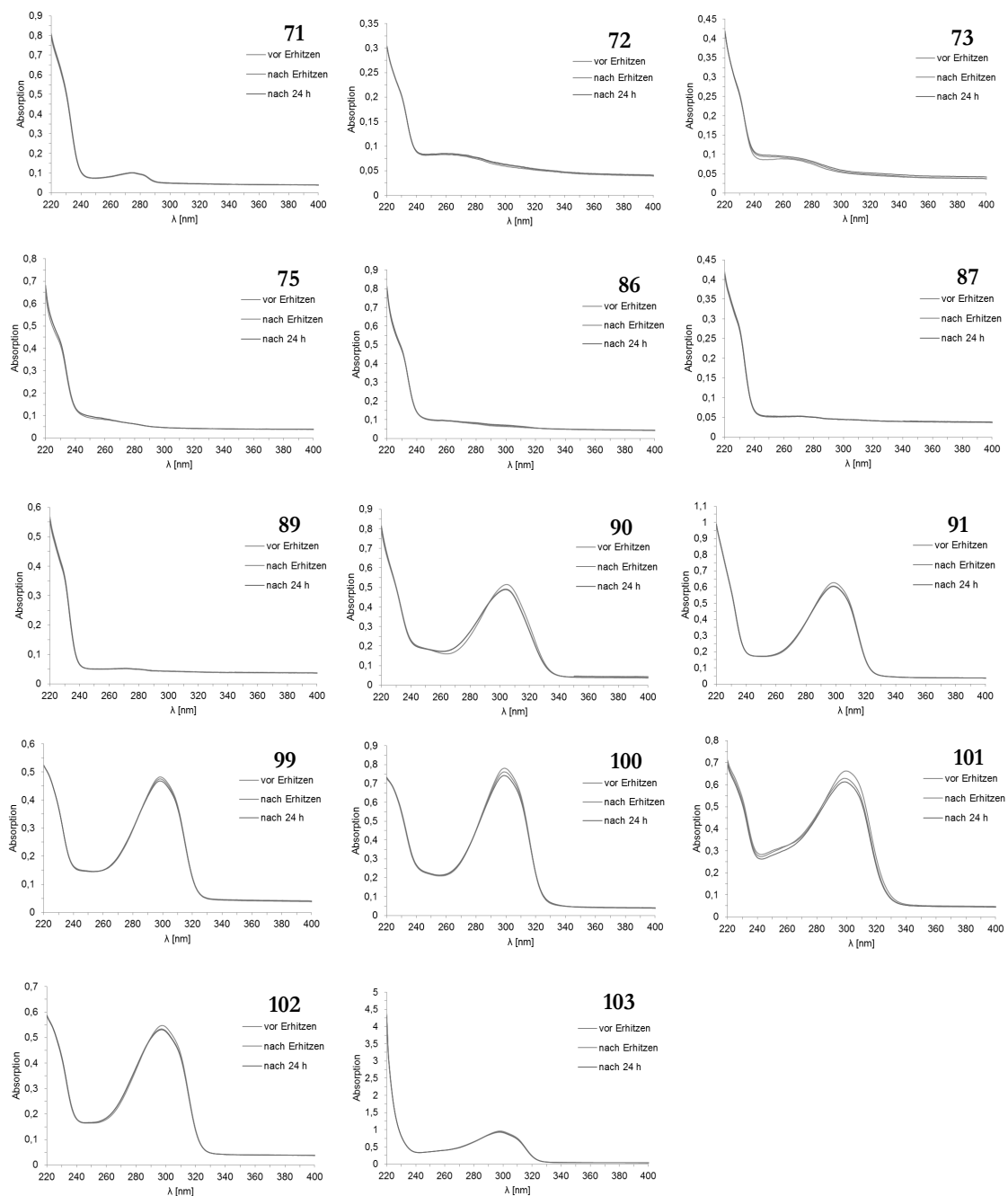


Abbildung 7-1: Durchführung der Stabilitätsmessung bei pH 7, $c(R) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 M Cacodylat-Puffer unter den Bedingungen der thermischen Denaturierung.

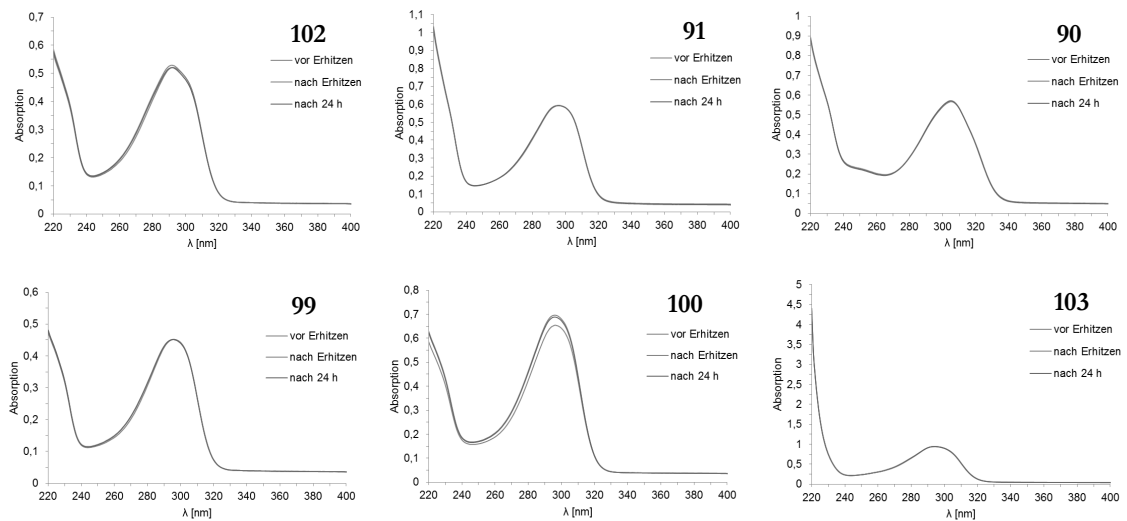


Abbildung 7-2: Durchführung der Stabilitätsmessung bei pH 5, $c(R) = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 M Cacodylat-Puffer unter den Bedingungen der thermischen Denaturierung.

7.1.2 Fluoreszenztitrationsexperimente

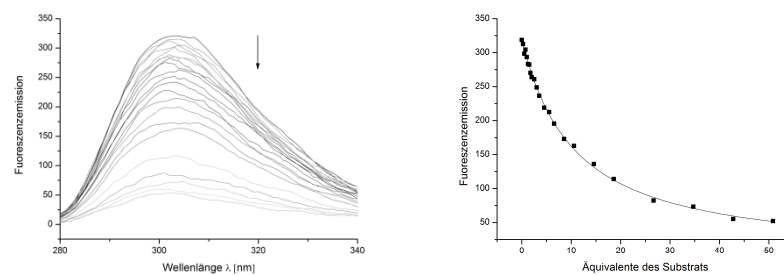


Abbildung 7-3: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **109** (AMP) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

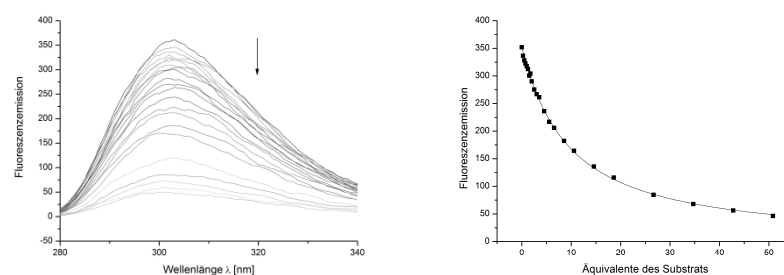


Abbildung 7-4: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **110** (ADP) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

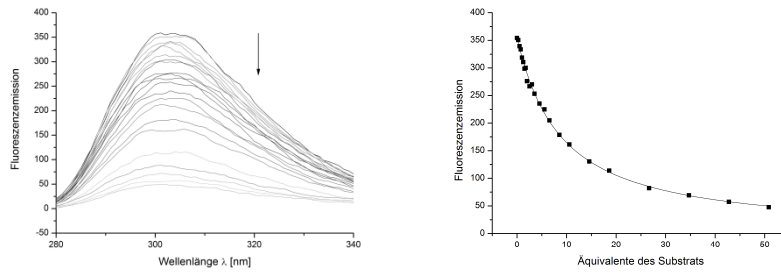


Abbildung 7-5: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **111** (ATP) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

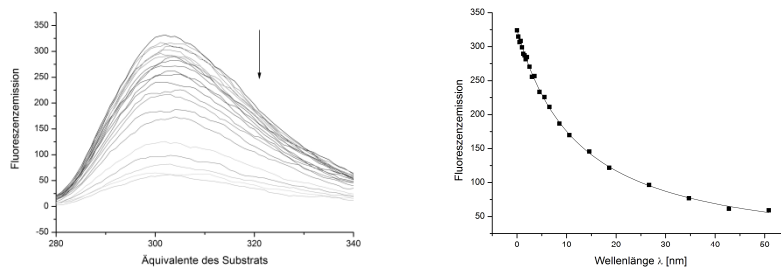


Abbildung 7-6: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **114** (cAMP) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

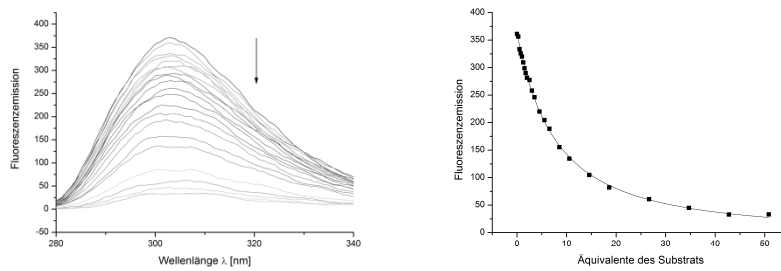


Abbildung 7-7: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **115** (CMP) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

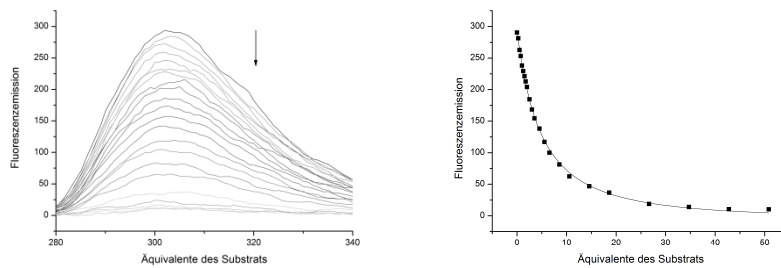


Abbildung 7-8: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **119** (NADH) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

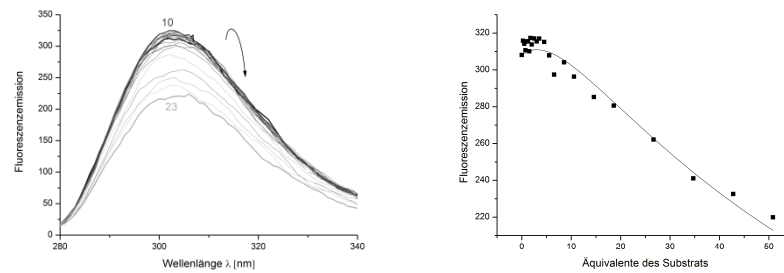


Abbildung 7-9: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **143** (*D*-Glucosamin) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

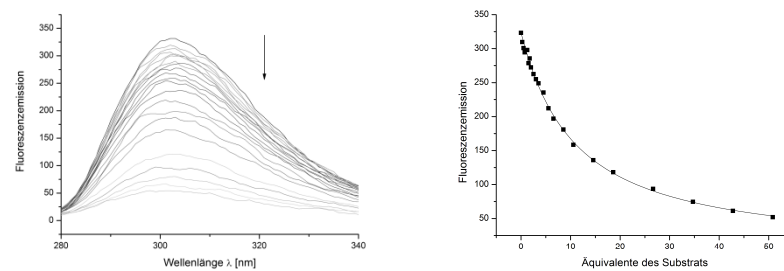


Abbildung 7-10: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **150** (Nitrat) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Origin*. (■ Messdaten, — Fit)

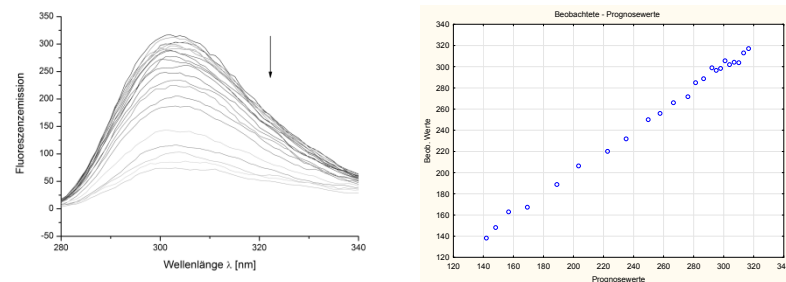


Abbildung 7-11: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **120** (ctDNA) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Statistica*.

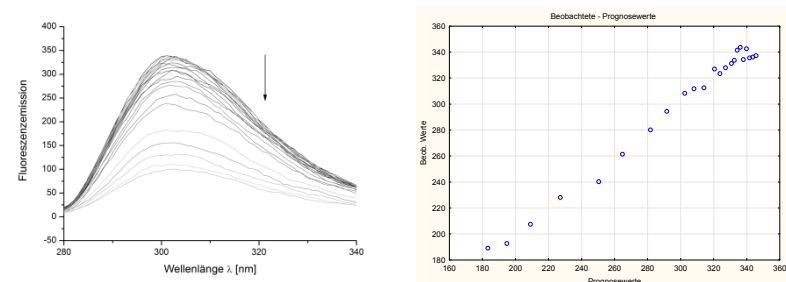


Abbildung 7-12: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **121** (RNA) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Statistica*.

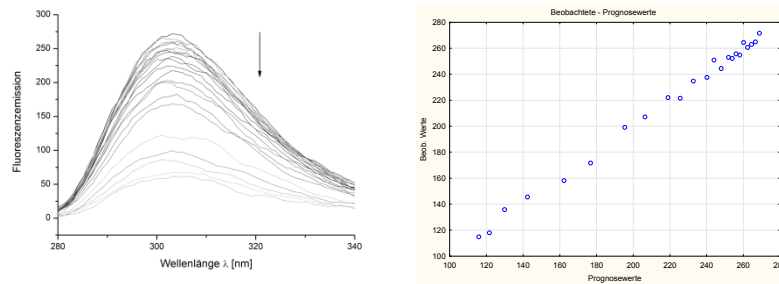


Abbildung 7-13: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **122** ($p(dAdT)_2$) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Statistica*.

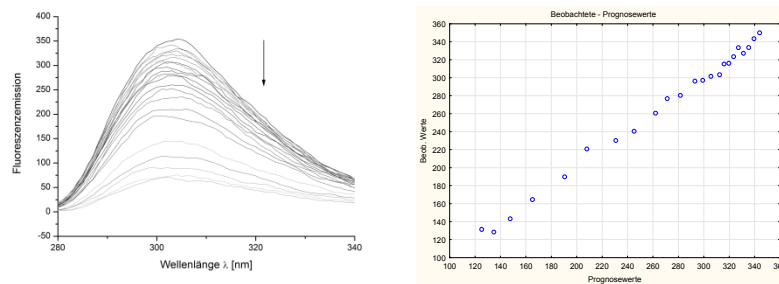


Abbildung 7-14: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **123** ($pdA \times pdT$) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Statistica*.

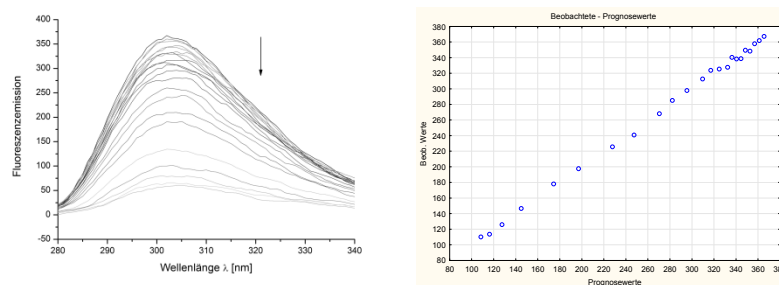


Abbildung 7-15: Fluoreszenztitration des Rezeptors **71** mit Substrat **124** ($p(dGdC)_2$) und Auswertung der Messdaten am Maximum von 305 nm mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit *Statistica*.

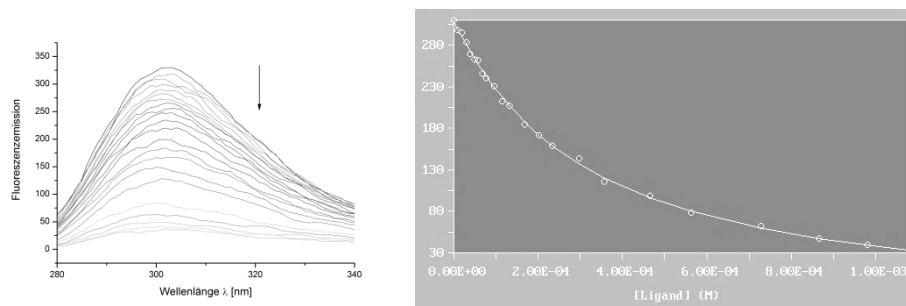


Abbildung 7-16: Fluoreszenztitration des Rezeptors **86** mit Substrat **109** (AMP) und Ausschnitt bei 297 nm der nicht-linearen Regressionsanalyse mit *SpecFit*. (○ Messdaten, — Fit)

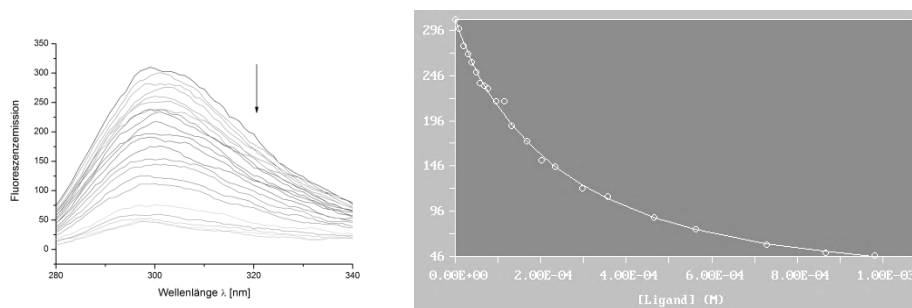


Abbildung 7-17: Fluoreszenztitration des Rezeptors **86** mit Substrat **110** (ADP) und Ausschnitt bei 300 nm der nicht-linearen Regressionsanalyse mit *SpecFit*. (○ Messdaten, — Fit)

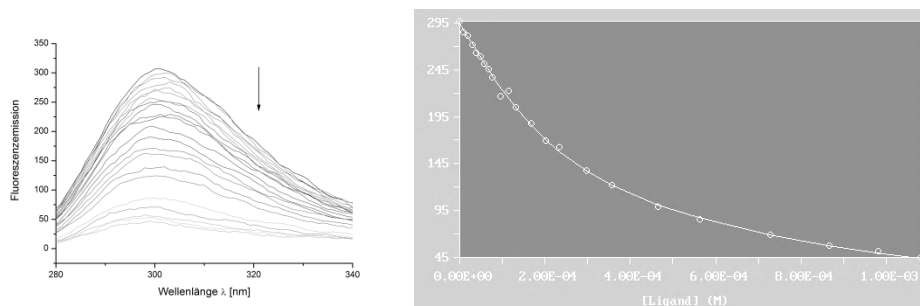


Abbildung 7-18: Fluoreszenztitration des Rezeptors **86** mit Substrat **111** (ATP) und Ausschnitt bei 297 nm der nicht-linearen Regressionsanalyse mit *SpecFit*. (○ Messdaten, — Fit)

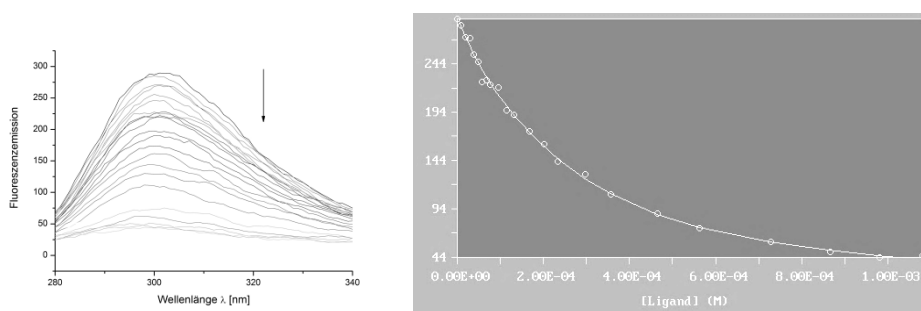


Abbildung 7-19: Fluoreszenztitration des Rezeptors **86** mit Substrat **150** (Nitrat) und Ausschnitt bei 303 nm der nicht-linearen Regressionsanalyse mit *SpecFit*. (○ Messdaten, — Fit)

7.1.3 HPLC-Reinheitläufe der Rezeptoren 71-73, 75, 86, 87, 89-91, 99-103

Säule: RP18-Material, 150 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μ m, 12 nm, Laufbedingungen: Gradient über 30 min, 10 % bis 100 % Methanol (0.05 % TFA-Zusatz), Flussrate: 0.43 ml·min⁻¹, Detektion bei 210 bzw. 220 nm.

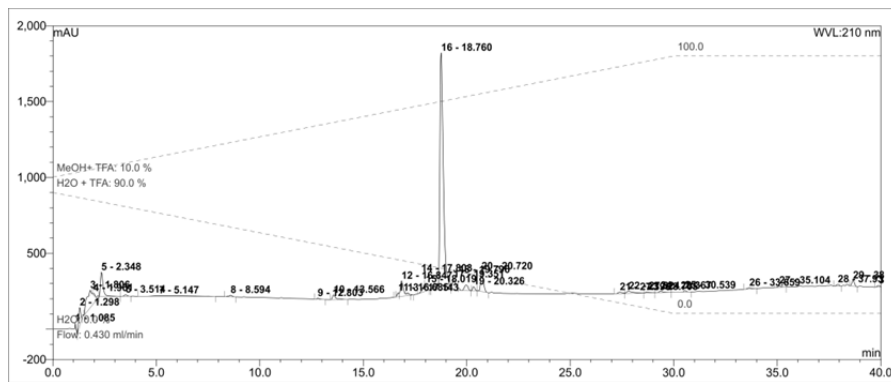


Abbildung 7-20: Rezeptor 71, Reinheit 95 %

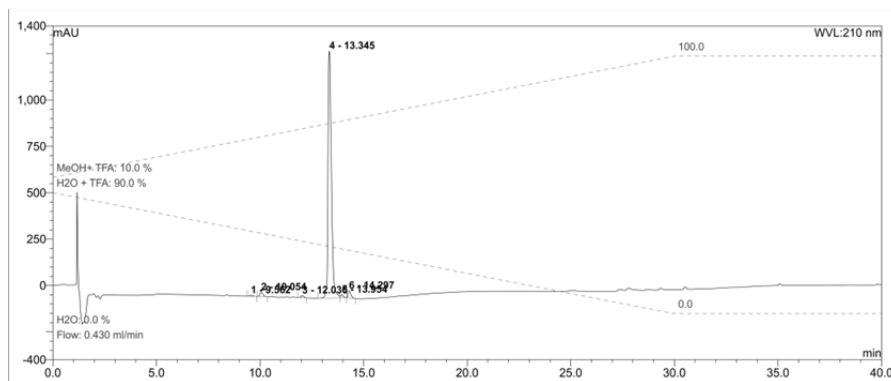


Abbildung 7-21: Rezeptor 72, Reinheit 94 %

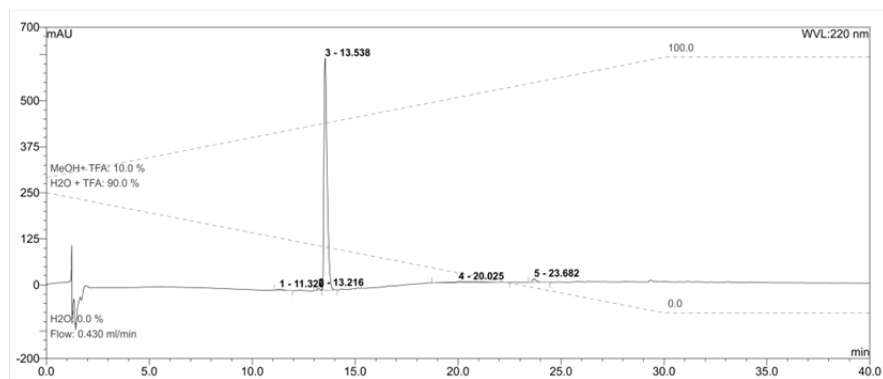


Abbildung 7-22: Rezeptor 73, Reinheit 93 %

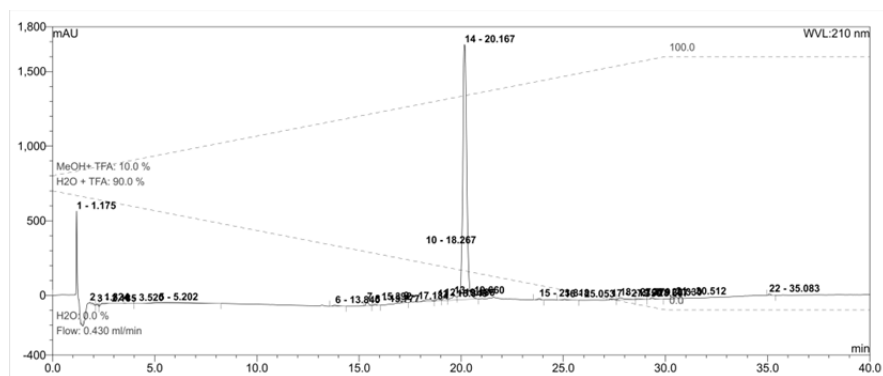


Abbildung 7-23: Rezeptor 75, Reinheit 95 %

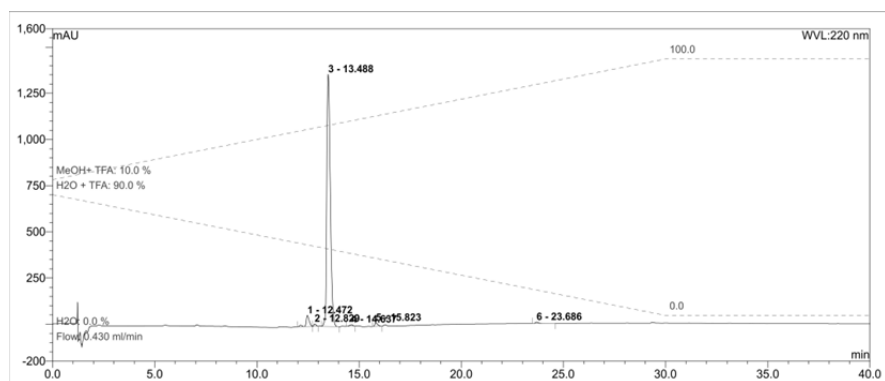


Abbildung 7-28: Rezeptor 91, Reinheit 94 %

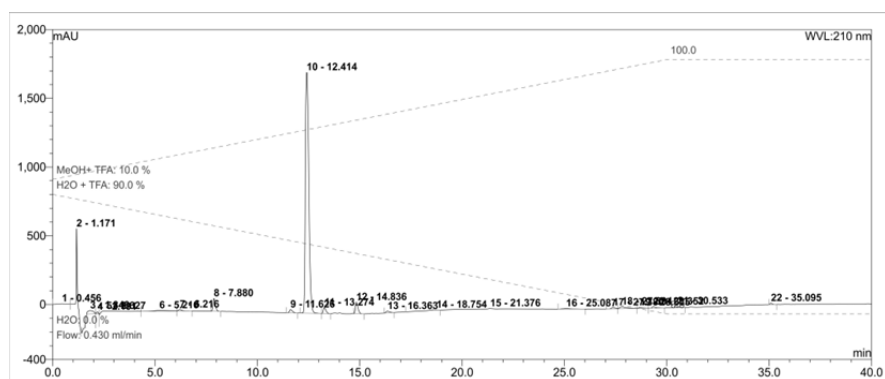


Abbildung 7-29: Rezeptor 100, Reinheit 91 %

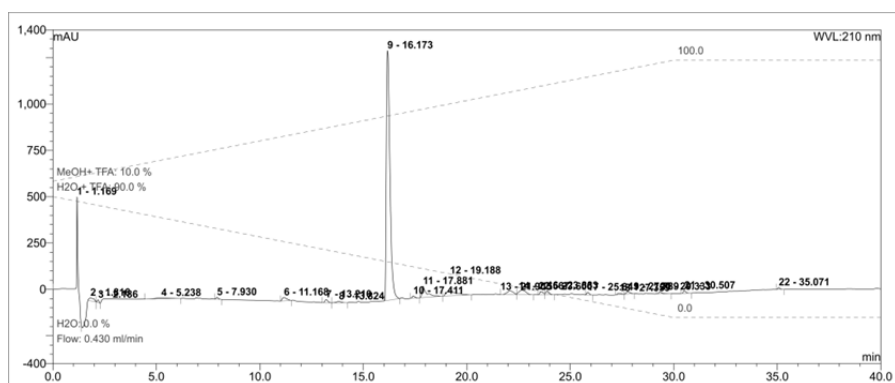


Abbildung 7-30: Rezeptor 101, Reinheit 94 %

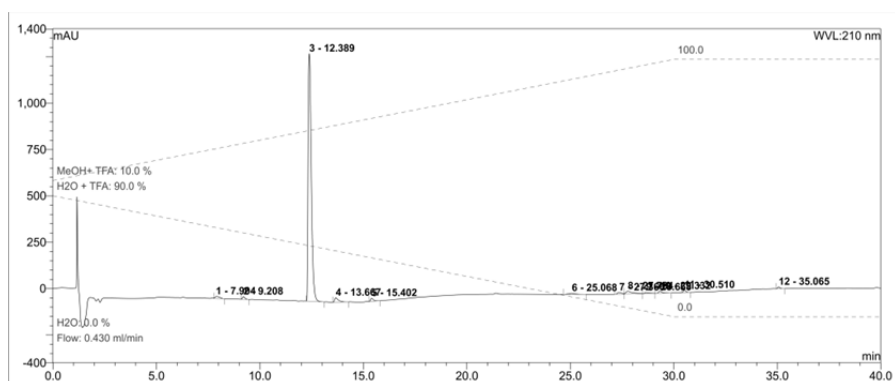


Abbildung 7-31: Rezeptor 102, Reinheit 91 %

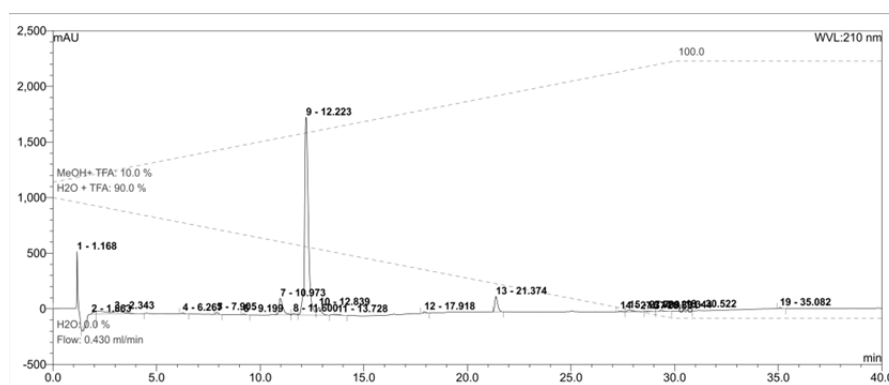


Abbildung 7-32: Rezeptor 103, Reinheit 94 %

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
°	Grad
°C	Grad Celsius
δ	Chemische Verschiebung
Δ	Delta
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
μ	mikro
A	Akzeptor
Ala	Alanin
AU	Absorbtionseinheit (absorbance units)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
ca.	circa
cAMP	Adenosin-3',5'-monophosphat (cyclisches AMP)
CBS	carboxylate binding site
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CRD	carbohydrate recognition domain
CyD	Cyclodextrin
konz.	konzentriert
D	Durchmesser
D	Donor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO _{d6}	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
Dp	N,N-Dimethylaminopropylamid
ds	doppelsträngig
Äq.	Äquivalent
ESI	electron spray ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>

Et₂O	Diethylether
f	femto
FT-IR	Fourier-transform infrared
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His	Histidin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hp	Hydroxypyrrol-Einheit
HPLC	Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie (high performance liquid chromatography)
HR-MS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
Ile	Isoleucin
Im	N-Methylimidazol-Einheit
J	Joule
k	Boltzmannkonstante
K	Kelvin
K	Bindungskonstante
KW	Kohlenwasserstoffe
l	Liter
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	milli
m	Meter
M	molar
m/z	Masse pro Ladung
Me	Methyl
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minuten
MHz	mega Hertz
MM	molecular mechanics
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether (2-Methoxy-2-methylpropan)
Mtr	Methoxytrimethylbenzolsulfonyl
Smp.	Schmelzpunkt
MPLC	medium performance liquid chromatography
n	nano
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
neg.	negativ
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	nuclear magnetic resonance
NMP	N-Methylpyrrolidin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pd/C	palladium on charcoal
pH	pondus hydrogenii
Phe	Phenylalanin

Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonylchlorid
PIDA	Phenylidosodiacetat
PN	Polynukleotid
PNA	Peptid-Nukleinsäure (peptide nucleic acid)
pos.	positive
PPI	polypropyleneimine
ppm	parts per million
Pro	Prolin
Py	<i>N</i> -Methylpyrrol-Einheit
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidiniophosphoniumhexafluorophosphat
r	radius
RNA	ribonucleic acid
RP18	reversed phase octadecyl chains
s	Sekunde
Ser	Serin
SiO₂	Silicagel
T	Temperatur
t	Zeit (time)
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TMP	2,4,6-Trimethylpyridin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolet
Val	Valin
Vis	visible
z. B.	zum Beispiel
Z-Osu	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyloxysuccinimid

CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

Geibel B., Merschky M., Rether C. Schmuck C., „*Artificial Enzyme Mimics*“, *Supramolecular Chemistry from Molecules to Nanomaterials*, (Hrsg.; P. A. Gale, J. W. Steed), Wiley-VCH.

Diplomarbeit, Geibel B., „*Design und Synthese von biomimetischen Kohlenhydratrezeptoren*“, Prof. Dr. C. Schmuck, Universität Würzburg, **2007**.

H. Braunschweig, H. Bera, B. Geibel, R. Dörfler, D. Götz, F. Seeler, T. Kupfer, K. Radacki, „*Synthesis of Half-Sandwich Tungsten Chlorogermyl and Chlorostannyl Complexes*“, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3416-3424.

Konferenzen

SupraChem „*Symposium in Supramolekularer Chemie*“, Essen/Deutschland, 24.-25.°Februar **2011**, Posterpräsentation.

7th ERA Flash Conference „*Bioinspired Chemistry*“, Santiago de Compostela/Spanien, 25.-27.°Oktober **2010**, Posterpräsentation

3rd EuCheMS Chemistry Congress „*Chemistry – The Creative Force*“, 29.°August-2.°September **2010**, Nürnberg/Deutschland, Posterpräsentation

1st International Symposium MAOPS „*Microwave-Assisted Organic and Peptide Synthesis*“, 4.-6.°Juni **2009**, Montpellier/Frankreich, Posterpräsentation

International Summer School „*Supramolecular Systems in Chemistry and Biology*“, Tuapse/Russland, 28. September–2. Oktober **2008**, Posterpräsentation

2nd EuCheMS Chemistry Congress „*Chemistry - The Global Science*“, Turin/Italien, 16.-20. September **2008**, Posterpräsentation

Chem-SyStM „*Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens*“, Würzburg/Deutschland, 4. Dezember **2007**, Posterpräsentation, Posterpreis der Merck KGaA

7.3 Literaturverzeichnis

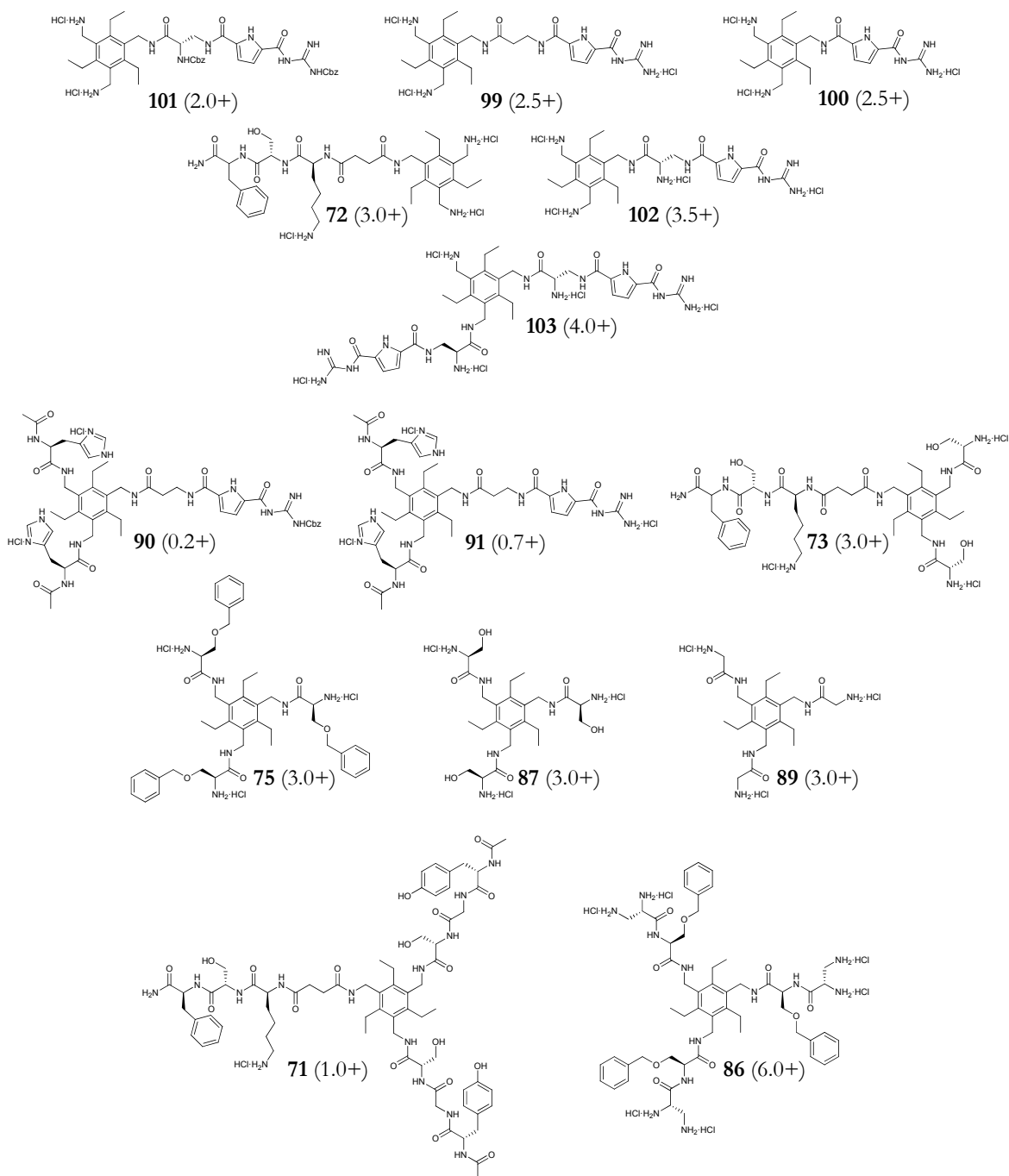
- 1 J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- 2 R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature*, **1953**, 171, 740-741.
- 3 L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum, Akad. Verl., **1996**, 4. Auflage.
- 4 E. Fischer, *Chem. Ber.*, **1894**, 27, 2985-2993.
- 5 F. W. Lichtenthaler, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 2456-2467.
- 6 D. E. Koshland, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 2468-2472.
- 7 K. Müller-Dethlefs, P. Hobza, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 143-167.
- 8 G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 2366-2393.
- 9 L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2382-2426.
- 10 J.-M. Lehn, *Resonance J. Sci. Edu.*, **1996**, 1, 39-53.
- 11 T. K. Lindhorst, *Chem. unserer Zeit*, **2000**, 34, 38-52.
- 12 S. Nath, *J Bioenerg Biomembr*, **2010**, 42, 301-309.
- 13 S. J. Riedl, G. S. Salvesen, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**, 8, 405-413.
- 14 T. Tojima, J. H. Hines, J. R. Henley, H. Kamiguchi, *Nat Rev Neurosci*, **2011**, 12, 191-203.
- 15 G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic acids in chemistry and biology*, RSC Publishing, Cambridge, **2006**.
- 16 R. Arni, U. Heinemann, M. Maslowska, R. Tokuoka, W. Saenger, *Acta Cryst.*, **1987**, B43, 548-554.
- 17 U. Heinemann, W. Saenger, *Nature*, **1982**, 299, 27-31.
- 18 C. N. Pace, U. Heinemann, U. Hahn, W. Saenger, *Angew. Chem*, **1991**, 103, 351-468.
- 19 M. Rauschenberg, S. Bomke, U. Karst, B. Ravoo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 7340-7345.
- 20 C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Biagini, E. Faggi, S. Meini, C. Giorgi, A. Spepi, B. Valtancoli, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 7349-7363.
- 21 H. Abe, Y. Mawatari, H. Teraoka, K. Fujimoto, M. Inouye, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 459-504.
- 22 A. V. Eliseev, H.-J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6081-6088.
- 23 S. E. Schneider, S. N. O'Neil, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 542-543.
- 24 A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, 37, 487-493.
- 25 S. M. Butterfield, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9580-9581.
- 26 H. Y. Kuchelmeister, C. Schmuck, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 5311-5318.
- 27 A. Ghosh, M. Bansal, *Acta Cryst.*, **2003**, D59, 620-626.
- 28 R. M. Wing, H. R. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickersen, *Nature*, **1980**, 287, 755-758.
- 29 S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Academic Press c/o Elsevier, **2008**.
- 30 F. M. Pohl, T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, **1972**, 67, 375-396.
- 31 R. Steel, F. Allain, *RNA*, **2005**, 11, 592-597.
- 32 Y. Tanaka, S. Fujii, H. Hiroaki, T. Sakata, T. Tanaka, S. Uesugi, K. Tomita, Y. Kyogoku, *Nucleic Acids Research*, **1999**, 27, 949-955.
- 33 S. Arnott, D. W. L. Hukins, S. D. Dover, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1972**, 48, 1392-1399.
- 34 G. S. Manning, *Acc. Chem. Res.*, **1979**, 12, 443-449.
- 35 X. Shui, L. McFail-Isom, G. G. Hu, L. D. Williams, *Biochemistry*, **1998**, 37, 8341-8355.
- 36 J. B. Chaires, *Biopolymers*, **1997**, 44, 201-215.
- 37 J. B. Chaires, *Anticancer Drug Des.*, **1996**, 11, 569-580.

- 38 T. Thomas, T. J. Thomas, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, 58, 244–258.
- 39 E. Westhof, D.L. Beveridge, *Water Sci. Rev.*, **1990**, 5, 24–136.
- 40 C. W. Garvie, C. Wolberger, *Molecular Cell*, **2001**, 8, 937-946.
- 41 M. Elrod-Erickson, T. E. Benson, C. O. Pabo, *Structure*, **1998**, 6, 451-464.
- 42 T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, S. C. Harrison, *Cell*, **1992**, 71, 1223-1237.
- 43 N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Nucleic Acids Research*, **2001**, 29, 2860-2874.
- 44 C. R. Kissinger, B. Liu, E. Martin-Blanco, T. B. Kornberg, C. O. Pabo, *Cell*, **1990**, 63, 579-590.
- 45 R. V. Talanian, C. J. McKnight, P. S. Kim, *Science*, **1990**, 249, 769-771.
- 46 X. Cheng, B. K. Kay, R. L. Juliano, *Gene*, **1996**, 171, 1-8.
- 47 D. Jantz, B. T. Amann, G. J. Gatto, J. M. Berg, *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 789–799 und Refs. darin.
- 48 H. Moser, P. D. Dervan, *Science*, **1987**, 238, 645-650.
- 49 T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhou, J.-L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Helene, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 7749-7760.
- 50 I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure*, **1994**, 2, 17-32.
- 51 I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure*, **1993**, 1, 135-152.
- 52 P. A. Beal, P. B. Dervan, *Science*, **1991**, 251, 1360-1363.
- 53 L. J. Maher III, B. Wold, P. B. Dervan, *Science*, **1989**, 245, 725-730.
- 54 L. J. Maher III, *Biochemistry*, **1992**, 31, 7587-7594.
- 55 P. E. Nielsen, *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 545-50.
- 56 L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science*, **1995**, 270, 1838-41.
- 57 P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 2215-2235.
- 58 J. L. Kim, D. B. Nikolow, S. K. Burley, *Nature*, **1993**, 365, 520-527.
- 59 Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn, P. B. Sigler, *Nature*, **1993**, 365, 512-520.
- 60 X. L. Gao, P. Mirau, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1992**, 223, 259-279.
- 61 S. Kamitori, F. Takusagawa, *J. Mol. Biol.*, **1992**, 225, 445-456.
- 62 S. Walker, J. Murnick, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7954-7961.
- 63 R. A. Kumar, N. Ikemoto, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.*, **1997**, 265, 187-201.
- 64 M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, D. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1985**, 82, 1376-1380.
- 65 T. A. Larsen, D. S. Goodsell, D. Cascio, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, 7, 477–491.
- 66 R. R. Sauers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 2573-2576.
- 67 D. Chang, S. Cheng, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1996**, 19, 279-285.
- 68 A. Czarny, D. W. Boykin, A. A. Wood, C. M. Nunn, S. Neidle, M. Zhao, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4716-4717.
- 69 D. G. Brown, M. R. Sanderson, E. Garman, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, **1992**, 226, 481-490.
- 70 K. J. Edwards, T. C. Jenkins, S. Neidle, *Biochemistry*, **1992**, 31, 7104-7109.
- 71 N. Spink, D. G. Brown, J. V. Skelly, S. Neidle, *Nucleic Acids Research*, **1994**, 22, 1607-1612.
- 72 C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconj. Chem.*, **1998**, 9, 513-538.
- 73 B. Ward, R. Rehfsuss, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, **1988**, 27, 1198-1205.
- 74 K. J. Breslauer, D. P. Remeta, W.-Y. Chou, R. Ferrante, J. Curry, D. Zaunczkowski, J. G. Snyder, L. A. Marky, *Biochemistry*, **1987**, 84, 8922-8926.
- 75 J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, 86, 5723-5727.
- 76 M. Coll, C. A. Frederick, A. H. J. Wang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, 84, 8385-8389.

- 77 J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Biochemistry*, **1988**, 27, 8088-8096.
- 78 J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1393-1399.
- 79 S. N. Mitra, M. C. Wahl, M. Sundaralingam, *Acta Crystallogr. Sect. D*, **1999**, 55, 602-609.
- 80 J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward, J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, **1986**, 25, 7408-7416.
- 81 K. Kissinger, K. Krowicki, J. C. Dabrowiak, J. W. Lown, *Biochemistry*, **1987**, 26, 5590-5595.
- 82 W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 8783-8794.
- 83 J. W. Lown, *J. Mol. Recognit.*, **1994**, 7, 79-88.
- 84 M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7983-7988.
- 85 P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 2215-2235.
- 86 J. Y. Cho, M. E. Parks, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92, 10389-10392.
- 87 C. L. Kielkopf, S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. C. Rees, *Science*, **1998**, 282, 111-115.
- 88 A. K. Mapp, A. Ansari, M. Ptashne, P. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 3930-3935.
- 89 F. Yanga, N. G. Nickols, B. C. Lia, G. K. Marinovc, J. W. Said, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2013** 110, 1863-1868.
- 90 L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18-30.
- 91 G. A. Patikoglou, J. L. Kim, L. Sun, S.-H. Yang, T. Kodadek, S. K. Burley, *Genes Dev.*, **1999**, 13, 3217-3230.
- 92 J. Chen, M. K. Ghorai, G. Kenney, J. Stubbe, *Nucleic Acids Research*, **2008**, 36, 3781-3790.
- 93 T. K. Lindhorst, *Chem. unserer Zeit*, **2000**, 34, 38-52.
- 94 N. Sharon, H. Lis, *Sci. Am.*, **1993**, 268, 82-89.
- 95 A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 3160-3179.
- 96 A. B. Boraston, D. N. Bolam, H. J. Gilbert, G. J. Davies, *Biochem. J.*, **2004**, 382, 769-781.
- 97 O. Sperling, A. Fuchs, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 3913-3922.
- 98 D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. Knight, *Science*, **1999**, 285, 1061-1066.
- 99 C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. Defusco, C. G. Augustine, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol.*, **2002**, 44, 903-918.
- 100 J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhler, C. S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. D. Greve, *Mol. Microbiol.*, **2005**, 55, 441-455.
- 101 N. K. Vyas, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1991**, 1, 732-740.
- 102 N. K. Vyas, M. N. Vyas, F. A. Quioco, *Science*, **1988**, 242, 1290-1295.
- 103 J. N. Varghese, J. McKimm-Breschkin, J. B. Caldwell, A. A. Kortt, P. M. Colman, *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1992**, 14, 327-332.
- 104 J. P. Carver, *Pure Appl. Chem.*, **1993**, 65, 763-770.
- 105 J. D. Dunitz, *Chem. Biol.*, **1995**, 2, 709-712.
- 106 R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 373-380.
- 107 F. A. Quioco, *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1293-1306.
- 108 E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1994**, 4, 719-728.
- 109 Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, 28, 321-327.
- 110 V. Kral, O. Rusin, F. P. Schmidtchen, *Org. Lett.*, **2001**, 3, 873-876.
- 111 M. Segura, B. Bricoli, A. Casnati, E. M. Munoz, F. Sansone, R. Ungaro, C. Vicent, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 6296-6303.
- 112 R. P. Bonar-Law, A. P. Davis, B. A. Murray, *Angew. Chem.*, **1990**, 102, 1497-1499.

- 113 M. Mazik, H. Bandmann, W. Sicking, *Angew. Chem.*, **2002**, *112*, 562-565.
- 114 E. Klein, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 298-302.
- 115 Y. Aoyama, Y. Nagai, J. Otsuki, K. Kobayashi, H. Toi, *Angew. Chem.*, **1992**, *104*, 785-786.
- 116 M. Mazik, H. Cavga, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, *22*, 3633-3638.
- 117 E. Klein, M. P. Crump, A. P. Davis, *Angew. Chem.*, **2004**, *117*, 302-306.
- 118 A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2397-2401.
- 119 E. Klein, Y. Ferrand, E. K. Auty, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2007**, 2390-2392.
- 120 Y. Ferrand, M. P. Crump, A. P. Davis, *Science*, **2007**, *318*, 619-622.
- 121 T. Reenberg, N. Nyberg, J. Duus, J. L. J. van Dongen, M. Meldal, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, *30*, 5003-5009.
- 122 G. Hennrich, E. V. Anslyn, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 2218-2224.
- 123 H.-J. Kim, Y.-H. Kim, J.-I. Hong, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 5049-5052.
- 124 M. Mazik, H. Bandmann, W. Sicking, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 551-554.
- 125 D. J. Iverson, G. Hunter, J. F. Blount, J. R. Damewood, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6073-6083.
- 126 H. E. Gottlieb, C. Ben-Ary, A. Hassner, V. Marks, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 4003-4014.
- 127 K. J. Wallace, W. J. Belcher, D. R. Turner, K. F. Syed, J. W. Steed, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9699-9715.
- 128 R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- 129 W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, **2000**.
- 130 A. Vacca, C. Nativi, M. Cacciarini, R. Pergoli, S. Roelens, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16456-16465.
- 131 M. Merschky, C. Schmuck, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 4895-4903.
- 132 B. Geibel, *Design und Synthese biomimetischer Kohlenhydratrezeptoren*, Diplomarbeit **2007**.
- 133 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.
- 134 M. E. Attardi, G. Porcu, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 7391-7394.
- 135 A. Vacca, C. Nativi, M. Cacciarini, R. Pergoli, S. Roelens, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16456-16465.
- 136 C. Schmuck, M. Merschky (unveröffentlichte Ergebnisse).
- 137 F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. V. Halbeek, R. G. Bergmann, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2686-2695.
- 138 G. J. Eppert, *Flüssigchromatographie, HPLC – Theorie und Praxis*, Vieweg Verlag, **1997**.
- 139 Novabiochem, Peptide Synthesis Katalog, 2010/2011.
- 140 F. Garcia-Martin, M. Quintanar-Audelo, Y. Garcia-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Cote, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *J. Comb. Chem.*, **2006**, *8*, 213-220.
- 141 C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6250-6284.
- 142 J. P. Tam, Y. A. Lu, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 12058-12063.
- 143 R. Merrifield, V. Littau, *Peptides*, North Holland Publishers, Amsterdam, **1968**.
- 144 J. M. Collinsa, N. E. Leadbeater, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1141-1150.
- 145 B. Bacsá, K. Horvati, S. Bosze, F. Andrae, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 7532-7542.
- 146 J. Hachmann, M. Lebl, *Biopolymers*, **2006**, *84*, 340-347.
- 147 B. Bacsá, C. O. Kappe, *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 2222-2227.
- 148 M. Brandt, S. Gammeltoft, K. J. Jensen, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **2006**, *12*, 349-357.
- 149 S. A. Palasek, Z. J. Cox, J. M. Collins, *J. Pept. Sci.*, **2007**, *13*, 143-148.
- 150 Funktionsweise und Nutzung des Discover SPS: http://www.cem.de/documents/frameset_prdkt.html, 30.07.2013.
- 151 X. Geng, F.E. Regnier, *J. Chrom.*, **1984**, *296*, 15-30.

- 152 D. Carr, *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC*, **2002**, 3. Auflage.
- 153 S. N. Maiti, P. Spevak, A.V. N. Reddy, *Synth. Commun.*, **1988**, *18*, 1201-1206.
- 154 S. Takano, T. Sugihara, S. Satoh, K. Ogasawara, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 6467-6471.
- 155 K. Soai, S. Yokoyama, A. Ookawa, *Synthesis*, **1987**, *1*, 48-49.
- 156 S. Murahashi, Y. Taniguchi, Y. Imada, Y. Tanigawa, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3292-3303.
- 157 J. Burguignon, A. Schoenfelder, M. Schmitt, C. Wermuth, V. Hechler, B. Charlier, M. Maitre, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *31*, 893-897.
- 158 C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *2*, 324-329.
- 159 J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides*, **2003**, *13*, 515-537.
- 160 N. V. Hud, J. Plavec, *Biopolymers*, **2003**, *69*, 144-158.
- 161 M. R. Stojković, I. Piantanida, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 7807-7814.
- 162 G. Kallansrud, B. Ward, *Anal. Biochem.*, **1996**, *236*, 134-138.
- 163 C. Schmuck, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, *250*, 3053-3067.
- 164 D. G. Alexeev, A. A. Lipanov, I. Ya. Skuratovskii, *Nature*, **1987**, *325*, 821-823.
- 165 A. C. Dock-Bregeon, B. Chevrier, A. Podjarny, D. Moras, J.S. deBear, G. R. Gough, P. T. Gilham, J. E. Johnson, *Nature*, **1988**, *335*, 375-378.
- 166 C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- 167 V. Bickert, Dissertation, *Neue künstliche Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren zur Komplexierung von Oxo-Anionen in Wasser*, **2008**.
- 168 K. Klemm, Dissertation, *Entwicklung neuer poly-kationischer Rezeptoren zur molekularen Erkennung von DNA und RNA*, **2011**.
- 169 M. Maeder, A. D. Zuberbühler, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 2220-2224.
- 170 P. Job, *Compt. Rend.*, **1925**, *180*, 928-930.
- 171 K. A. Connors, *Binding Constants in The Measurement of Molecular Complex*, Wiley, New York, **1987**.
- 172 G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1949**, *51*, 660-672.
- 173 J. D. McGhee, P. H. v. Hippel, *J. Mol. Biol.*, **1974**, *86*, 469-489.
- 174 T. Heyduk, J. C. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 1744-1748.
- 175 F. W. Sevenich, J. Langowski, V. Weiss, K. Rippe, *Nucl. Acids Res.*, **1998**, *26*, 1373-1381.
- 176 N. W. Luedtke, Dissertation, University of California, San Diego **2003**.
- 177 F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comp. Chem.*, **1990**, *11*, 440-467.
- 178 M. Heil, PhD thesis, Bayerischen Julius-Maximilians-Universität (Würzburg), **2004**.
- 179 G. D Fasman, *Practical handbook of biochemistry and molecular biology*, CRC Press LLC, Florida, **1989**.



Strukturen der Rezeptoren **71-73**, **75**, **87**, **89**, **90**, **91** und **99-103**, die in den Denaturierungsexperimenten mit den verschiedenen Nukleinsäuren untersucht wurden. Die Rezeptoren sind nach der Anzahl ihrer Arme und nach ihrem symmetrischen bzw. unsymmetrischen Aufbau geordnet. Die Angabe in Klammern bezieht sich auf die Anzahl der Ladungen bei pH 7.